

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055693 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00152

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE

LIMMER, Stephan [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). ROST, Sylvia [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). HADWIGER, Philipp [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49a, 91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(72) Erfinder; und

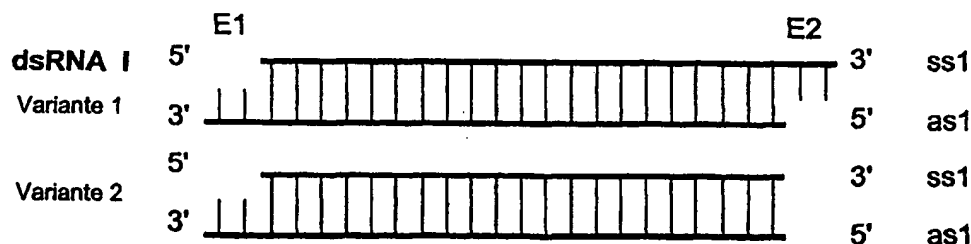
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KREUTZER, Roland [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINE ZIELGENS



(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 - 4 nucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte: Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinn-Strang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA am einen Ende (E1) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

WO 02/055693 A2



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens.

5

Aus der WQ 99/32619 sowie der WO 00/44895 sind Verfahren zur Hemmung der Expression von medizinisch oder biotechnologisch interessanten Genen mit Hilfe einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) bekannt. Die bekannten Verfahren sind zwar
10 hoch effektiv. Es besteht gleichwohl das Bedürfnis, deren Effizienz weiter zu steigern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere
15 ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament angegeben werden, mit denen eine noch effizientere Hemmung der Expression eines Zielgens erreichbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 41 und
20 81 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 40, 42 bis 80 und 82 bis 120.

Mit den erfindungsgemäß beanspruchten Merkmalen wird überraschenderweise eine drastische Erhöhung der Effektivität der
25 Hemmung der Expression eines Zielgens in vitro und in vivo erreicht. Durch die besondere Ausbildung der Enden der dsRNA kann sowohl deren Effizienz bei der Vermittlung der hemmenden Wirkung auf die Expression eines Zielgens als auch deren Stabilität gezielt beeinflusst werden. Durch die Vergrößerung der
30 Stabilität wird die wirksame Konzentration in der Zelle erhöht.

Unter einem "Zielgen" im Sinne der Erfindung wird der DNA-Strang der doppelsträngigen DNA in der Zelle verstanden, welcher
35 komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Be-

reiche ist. Bei dem "Zielgen" handelt es sich also im allgemeinen um den Sinnstrang. Der eine Strang bzw. Antisinnstrang (as1) kann komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder deren Prozessierungsprodukt, z.B. eine mRNA, sein. Unter "Einführen" wird die Aufnahme in die Zelle verstanden. Die Aufnahme kann durch die Zelle selbst erfolgen; sie kann auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Unter einem "Überhang" wird ein endständiger einzelsträngiger Überstand verstanden, welcher nicht nach Watson & Crick gepaarte Nukleotide aufweist. Unter einer "doppelsträngigen Struktur" wird eine Struktur verstanden, bei der die Nukleotide der Einzelstränge im Wesentlichen nach Watson & Crick gepaart sind. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann eine doppelsträngige Struktur auch einzelne Fehlpaarungen ("Mismatches") aufweisen.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs bzw. Antisinnstrangs as1 und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs bzw. Sinnstrang ss1 auf. Die dsRNA I kann auch an einem Ende glatt ausgebildet sein. In diesem Fall befindet sich das glatte Ende vorteilhafterweise auf der Seite der dsRNA I, die das 5'-Ende des einen Strangs (Antisinnstrang; as1). In dieser Ausbildung zeigt die dsRNA I einerseits eine sehr gute Effektivität und andererseits eine hohe Stabilität im lebenden Organismus. Die Effektivität insgesamt in vivo ist hervorragend. Der Überhang ist zweckmäßigerweise aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise aus 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal kann die Effektivität des Verfahrens weiter erhöht werden, wenn zumindest eine entsprechend der erfindungsgemäßen dsRNA I ausgebildete weitere dsRNA II in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs der doppelsträngigen Struktur der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist, und wobei

ein weiterer Strang oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs der doppelsträngigen Struktur der weiteren dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist. Die Hemmung der Expression des Zielgens ist in diesem Fall deutlich gesteigert. Der erste und der zweite Bereich können abschnittsweise überlappen, aneinander grenzen oder auch voneinander beabstandet sein.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, wenn die dsRNA I und/oder die weitere dsRNA II eine Länge von weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweisen. Als besonders effektiv hat sich eine Länge im Bereich zwischen 19 und 23 Nukleotidpaaren erwiesen. Die Effizienz kann weiter gesteigert werden, wenn an den vorzugsweise aus 19 bis 23 Nukleotidpaaren gebildeten Doppelsträngen einzelsträngige Überhänge von 1 bis 4 Nukleotiden vorhanden sind.

Das Zielgen kann nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal eine der in dem anhängenden Sequenzprotokoll wiedergegebenen Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweisen. Es kann auch aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene zur Expression von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierende Molekülen sowie Gene zur Expression des EGF-Rezeptors. Beim Zielgen kann es sich insbesondere um das MDR1-Gen handeln. Es kann in diesem Zusammenhang eine der Sequenzen SQ141 - 173 bestehende bzw. ein aus jeweils zusammengehörenden Antisinn (as)- und Sinnsequenzen (ss) kombinierte dsRNA I/II verwendet werden.

Nach einem weiteren vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal wird die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt.

Das Zielgen wird zweckmäßigerweise in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert. Es kann Bestandteil eines Virus oder Viroids, insbesondere eines humanpathogenen Virus oder Viroids, sein. Das Virus oder Viroid kann auch ein
5 tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist vorgesehen, dass die ungepaarten Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

10

Zumindest ein Ende der dsRNA I/II kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Vorteilhafterweise wird dazu der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt
15 der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-
20 Ionenkoordination gebildet werden. Es hat sich weiter als zweckmäßig und die Stabilität erhöhend erwiesen, wenn die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes gebildet ist. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen hinsichtlich der chemischen Verknüpfung können den Merkmalen der Ansprüche 24
25 bis 30 entnommen werden, ohne dass es dafür einer näheren Erläuterung bedarf.

Die dsRNA I/II kann dann besonders einfach in die Zelle eingeschleust werden, wenn sie in micellare Strukturen, vorteil-
30 hafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird. Zum Transport der dsRNA I/II in die Zelle hat es sich auch als vorteilhaft erwiesen, dass diese an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon um-
35 geben werden. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Das Hüllprotein kann insbesondere das Virus-Protein

1 und/oder das Virus-Protein 2 des Polyomavirus enthalten. Nach einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist. Ferner ist es von Vorteil, dass der eine Strang der dsRNA I/II (as1/2) zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist. Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Weiterhin hat es sich gezeigt, dass die dsRNA I/II vorteilhafterweise bereits in einer Menge von höchstens 5 mg/kg Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht werden kann. Bereits in dieser geringen Dosis wird eine ausgezeichnete Effektivität erzielt.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen und dann oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht werden kann.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (Antisinnstrang; as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausrei-

chenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur
5 komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der dsRNA I/II
10 wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen und Ausführungsbeispiele beispielhaft erläutert. Es zeigen:

15 Fig. 1a, b schematisch eine erste und zweite doppelsträngige RNA und

Fig. 2 schematisch ein Zielgen,

20 Fig. 3 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (erstes Experiment),

Fig. 4 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (zweites Experiment),
25

Fig. 5 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (drittes Experiment),
30

Fig. 6 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (viertes Experiment),
35

- Fig. 7 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in HeLa-S3-Zellen (fünftes Experiment),
- 5 Fig. 8 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,
- 10 Fig. 9 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-S3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw. nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,
- 15 Fig. 10 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 11 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in humanem Serum,
- 20 Fig. 12 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 13 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach Inkubation in humanem Serum,
- 25 Fig. 14 gelelektrophoretische Auftrennung von K3 nach Inkubation in Maus-Serum,
- 30 Fig. 15 gelelektrophoretische Auftrennung von PKC1/2 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 16 gelelektrophoretische Auftrennung von S1A/S4B nach Inkubation in humanem Serum,

- Fig. 17 gelelektrophoretische Auftrennung von K2 nach Inkubation in humanem Serum und
- 5 Fig. 18 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Nieren-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 19 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Herz-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- 10 Fig. 20 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Pankreas-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- 15 Fig. 21 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Plasma,
- Fig. 22 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression in der Niere,
- 20 Fig. 23 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Herz,
- Fgi. 24 Western-Blot-Analyse der EGFR-Expression in U-87 MG Glioblastom-Zellen,
- 25 Fig. 25a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 74 Stunden geerntet wurden,
- 30 Fig. 25b Quantifizierung der Banden nach Fig. 25a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,
- 35 Fig. 26a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 48 Stunden geerntet wurden,

Fig. 26b Quantifizierung der Banden nach Fig. 26a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,

5

Fig. 27 vergleichende Darstellung einer durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer Transfektion mit 175 nM dsRNA (Sequenz R1 in Tabelle 4).

10

Die in den Fig. 1a und 1b schematisch gezeigten doppelsträngigen Ribonukleinsäuren dsRNA I und dsRNA II weisen jeweils ein erstes Ende E1 und ein zweites Ende E2 auf. Die erste und die zweite Ribonukleinsäure dsRNA I/dsRNAII weisen an ihren
15 beiden Enden E1 und E2 einzelsträngige, aus etwa 1 bis 4 ungepaarten Nukleotiden gebildete Abschnitte auf. Es sind zwei mögliche Varianten dargestellt (Variante 1 und 2), wobei Variante 2 ein glattes Ende (E2) aufweist. Das glatte Ende kann jedoch auch in einer weiteren Variante am anderen Ende (E1)
20 liegen.

In Fig. 2 ist schematisch ein auf einer DNA befindliches Zielgen gezeigt. Das Zielgen ist durch einen schwarzen Balken kenntlich gemacht. Es weist einen ersten Bereich B1 und einen
25 zweiten Bereich B2 auf.

Jeweils der eine Strang der ersten dsRNA I (as1) bzw. der zweiten dsRNA II (as2) ist komplementär zum entsprechenden Bereich B1 bzw. B2 auf dem Zielgen.

30

Die Expression des Zielgens wird dann besonders wirkungsvoll gehemmt, wenn die dsRNA I/dsRNA II an ihren Enden E1, E2 einzelsträngige Abschnitte aufweist. Die einzelsträngigen Abschnitte können sowohl am Strang as1 oder as2 als auch am Gegenstrang (ss1 bzw. ss2) oder am Strang as1, as2 und am Gegenstrang ausgebildet sein.
35

Die Bereiche B1 und B2 können, wie in Fig. 2 gezeigt, von einander beabstandet sein. Sie können aber auch aneinander grenzen oder überlappen.

5

I. Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten:

Es wurden aus Sequenzen des Yellow Fluorescent Proteine (YFP), einer Variante des GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) der Alge *Aequoria victoria* abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) hergestellt und zusammen mit einem YFP-kodierenden Plasmid in Fibroblasten mikroinjiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme gegenüber Zellen ohne dsRNA ausgewertet.

Versuchsprotokoll:

Mittels eines RNA-Synthesizer (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen SQ148, 149 und SQ159 ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mit Hilfe der HPLC. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur. Die so erhaltenen dsRNAs wurden in die Testzellen mikroinjiziert.

Als Testsystem für diese Zellkultur-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, ECACC No. 93061524 (European Collection of Animal Cell Culture). Für die Mikroinjektionen wurde das Plasmid pcDNA-YFP verwendet, das ein 800bp großes Bam HI/Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vectors pcDNA3 enthält. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mit-transfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Die Auswer-

tung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte frühestens 3 Stunden nach Injektion anhand der grünen Fluoreszenz.

Vorbereitung der Zellkulturen:

5 Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom) im Brutschrank unter 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C. Die Zellen wurden
10 alle 3 Tage passagiert, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Einen Tag vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/TEDTA, Biochrom) und mit einer Zelldichte von 0,3 x 10⁵ Zellen in beschichteten Petrischalen (CORNING® Cell Culture Dish, 35 mm, Corning Inc., Corning, USA) ausgesät. Die Petri-
15 schalen wurden mit 0,2 % Gelatine (Biochrom) für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und sofort für die Aussaat der Zellen verwendet. Um ein Wiederfinden individueller Zellen zu ermöglichen, wurden CELLocate Coverslips der Fa. Eppendorf (Square size 55 µm) verwendet.

20

Mikroinjektion:

Zur Durchführung der Mikroinjektion wurden die Petrischalen ca. 10 Minuten aus dem Brutschrank genommen. Pro Schale und Ansatz wurden ca. 50 Zellen mikroinjiziert (FemtoJet; Mikro-
25 manipulator 5171, Eppendorf). Für die Mikroinjektion wurden Glaskapillaren (FemtoTip) der Firma Eppendorf mit einem Spitzeninnendurchmesser von 0,5 µm verwendet. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden und der Druck 30 hPa. Durchgeführt wurden die Mikroinjektionen an einem Olympus IX50 Mikroskop mit
30 Fluoreszenzeinrichtung. Als Injektionspuffer wurde 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,0 verwendet, der 0,01 µg/µl pcDNA-YFP enthielt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Mikroinjektion wurde der Injektionslösung jeweils 0,08% (w/v) an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot (Molecular Probes,
35 Leiden, Niederlande) zugesetzt. Um die Inhibition der YFP-Expression mit spezifischer dsRNA zu untersuchen, wurden der

Injektionslösung dsRNAs zugegeben: Ansatz 1: 0,1 μ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/149); Ansatz 2: 0,1 μ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/159); Ansatz 3: ohne RNA. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen für mindestens drei weitere
5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die intrazelluläre YFP-Fluoreszenz am Mikroskop ausgewertet:
gleichzeitig rot und grün-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, es wird keine Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA beobachtet; bzw. es handelt sich um
10 Kontrollzellen, in die keine dsRNA injiziert wurde;
nur rot-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, die dsRNA inhibiert YFP-Expression.

Ergebnisse:

15 Bei einer dsRNA-Konzentration von 0,1 μ M konnte beim Einsatz der dsRNA mit den an beiden 3'-Enden um je zwei Nukleotide überstehenden Einzelstrangbereichen (Sequenzprotokoll SQ148/159) eine merklich erhöhte Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten beobachtet werden im Vergleich zur
20 dsRNA ohne überstehende Einzelstrangenden (Tabelle 1).

Die Verwendung von kurzen, 19-25 Basenpaare enthaltenden, dsRNA-Molekülen mit Überhängen aus wenigen, vorzugsweise 1 bis 3 nicht-basengepaarten, einzelsträngigen Nukleotiden er-
25 möglicht somit eine vergleichsweise stärkere Hemmung der Genexpression in Säugerzellen als die Verwendung von dsRNAs mit derselben Anzahl von Basenpaaren ohne die entsprechenden Einzelstrangüberhänge bei jeweils gleichen RNA-Konzentrationen.

30

Ansatz	Name	Sequenzprotokoll-Nr.	0.1 μ M
1	S1A/ S1B	SQ148 SQ149	+
2	S1A/ S4B	SQ148 (überstehende Enden) SQ159	+++
3		ohne RNA	-

Tabelle 1: Die Symbole geben den relativen Anteil an nicht oder schwach grün-fluoreszierenden Zellen an (+++ > 90%; ++ 60-90%; + 30-60%; - < 10%).

5

II. Hemmung der Genexpression eines Zielgens in kultivierten HELA-S3-Zellen und Mausfibroblasten durch dsRNA:

- 10 Die Effektivität der Inhibition der YFP-Expression nach transienter Transfektion eines YFP-codierenden Plasmids auf der Basis der RNA-Interferenz mit dsRNAs läßt sich durch Gestaltung der 3'-Enden und der Länge des basengepaarten Bereichs modulieren.

15

Ausführungsbeispiel:

- Zum Wirksamkeitsnachweis der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der Genexpression wurden transient transfizierte
- 20 NIH/3T3-Zellen (Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo, ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 93061524) und HELA-S3 (humane cervikale Karzinomzellen, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Nr. ACC 161) verwendet. Für die Transfektion wurde das Plasmid pcDNA-YFP
- 25 verwendet, das ein 800 bp großes Bam HI /Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pcDNA3 enthält. Aus der Sequenz des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) wurden herge-

stellt und zusammen mit dem Plasmid pcDNA-YFP transient in die Fibroblasten transfiziert (Die verwendeten spezifischen dsRNAs sind in ihren Antisinn-Strängen komplementär zu entsprechenden Abschnitten der Gensequenzen von sowohl YFP als auch GFP). Nach 48 Stunden wurde die Fluoreszenzabnahme quantifiziert. Als Kontrollen fungierten Zellen, die entweder nur mit pcDNA-YFP oder mit pcDNA-YFP und einer Kontroll-dsRNA (nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet) transfiziert wurden.

10 Versuchsprotokoll:

dsRNA-Synthese:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/ Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Aussaat der Zellen:

30 Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der NIH/3T3-Zellen und der HELA-S3 erfolgte im Brutschrank (CO₂-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter

Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom), für die Mausfibroblasten, und Ham's F12 für die HELA-Zellen mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA, Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Platte (Multiwell Schalen 96-Well Flachboden, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µl Wachstumsmedium ausgesät.

15

Durchführung der transienten Transfektion:

Die Transfektion wurde mit Lipofectamine Plus™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden 0,15 µg pcDNA-YFP-Plasmid eingesetzt. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug 60 µl. Es wurden jeweils 3-fach-Proben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zuerst zusammen mit der dsRNA komplexiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA und die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt und pro 0,1 µg Plasmid-DNA 1 µl PLUS Reagent eingesetzt (in einem Volumen von 10 µl) und nach dem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde pro 0,1 µg Plasmid-DNA 0,5 µl Lipofectamine in insgesamt 10 µl serumfreiem Medium verdünnt, gut gemischt, zu dem Plasmid/dsRNA/PLUS-Gemisch zugegeben und nochmals 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 200 µl serumfreiem Medium gewaschen und danach mit 40 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine pro

Well wurden die Zellen für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Inkubation 1 x mit 200 μ l Wachstumsmedium gewaschen und für 24 Stunden bis zur Detektion der Fluoreszenz in 200 μ l Wachstumsmedium im Brutschrank inkubiert.

Detektion der Fluoreszenz:

24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (IX50-S8F2, Fluoreszenz-Einheit U-ULS100Hg, Brenner U-RFL-T200, Olympus) mit einer USH-I02D-Quecksilber-Lampe (USHIO Inc., Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem WIB-Fluoreszenz-Würfel und einer digitalen CCD-Kamera (Orca IIIm, Hamamatsu) und C4742-95 Kamera-Controller) photographiert. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der analysis-Software 3.1 (Soft Imaging Sytem GmbH, Deutschland). Um die YFP-Fluoreszenz in Relation zur Zelldichte zu setzen, wurde eine Zellkernfärbung (Hoechst-Staining) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 μ l Methycarnoy (75% Methanol, 25% Eisessig) zuerst für 5 und danach nochmals für 10 Minuten in Methycarnoy fixiert. Nach dem Lufttrocknen wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit 100 μ l pro Well Hoechst-Farbstoff (75 ng/ml) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS (PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom) wurden die Hoechst-gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, WU-Fluoreszenz-Würfel für Hoechst) photographiert.

In den Fig. 3 bis 9 sind die Ergebnisse zur Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA in kultivierten Zellen zusammengefasst:

In Fig. 3, 4, 5 und 6 sind die Effekte von YFP-spezifischen dsRNAs und von Kontroll-dsRNAs auf die YFP-Expression in NIH/3T3-Mausfibroblasten nach transienter Transfektion zusammengefasst. Die Experimente wurden wie im Versuchsprotokoll

beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der dsRNA bezieht sich auf die Konzentration im Medium während der Transfektionsreaktion. Die Bezeichnungen für die dsRNAs sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz pro Bildausschnitt in Flächenprozent. Pro Well wurden 3 verschiedene Bildausschnitte ausgewertet. Die Mittelwerte ergeben sich aus den 3-fach-Ansätzen.

In den Fig. 7 und 9 ist die spezifische Inhibition der YFP-Genexpression durch dsRNAs in HELA-S3-Zellen dargestellt.

- 10 In Fig. 7 ist die hemmende Wirkung unterschiedlich gestalteter dsRNA-Konstrukte (Tabelle 2) in verschiedenen Konzentrationen auf die Expression von YFP in HeLa-Zellen dargestellt. Fig. 8 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten NIH/3T3-Maus-
- 15 fibroblasten ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

8A: YFP-Kontrolle

8B: S1, 10 nM

8C: S4, 10 nM

20 8D: S7, 10 nM

8E: S7/S11, 1 nM

8F: S7/S12, 1 nM

- Fig. 9 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten HELA-3S-Zellen ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).
- 25

9A: K2-Kontrolle, 10 nM

9B: S1, 10 nM

30 9C: S4, 10 nM

9D: S7, 10 nM

9E: S7/11, 1 nM

9F: S7/12, 1 nM

9G: S1A/S4B, 10 nM

9H: YFP-Kontrolle

Ergebnisse:

- 5 Fig. 3 zeigt, dass die YFP-Expression nach transienter
Kotransfektion von Mausfibroblasten mit dem YFP-Plasmid und
spezifisch gegen die YFP-Sequenz gerichteten dsRNAs dann be-
sonders wirkungsvoll gehemmt wird, wenn die 3'-Enden der 22
und 19 Basenpaare enthaltenden Bereiche der dsRNAs einzel-
10 strängige Abschnitte von 2 Nukleotiden (nt) aufweisen. Wäh-
rend die dsRNA S1 mit glatten 3'-Enden bei einer Konzentration
von 1 nM (bezogen auf die Konzentration im Zellkultur-
Medium während der Durchführung der Transfektion) keine inhi-
bitorischen Effekte auf die YFP-Expression zeigt, inhibieren
15 die dsRNAs S7 (19 Nukleotidpaare) und S4 (22 Nukleotidpaare)
mit jeweils 2nt Überhängen an beiden 3'-Enden die YFP-
Expression um 50 bzw. um 70% im Vergleich zu den entsprechen-
den Kontroll-dsRNAs K3 und K2. Bei einer Konzentration von 10
nM inhibiert die als S1 bezeichnete dsRNA mit glatten Enden
20 die YFP-Expression um ~65%, während die Inhibition der YFP-
Expression durch die S4 dsRNA ~93% beträgt (Fig. 4). Der in-
hibitorische Effekt der mit S4 und S7 bezeichneten dsRNAs ist
konzentrationsabhängig (Fig. 3 und 4, siehe auch Fig. 7).
- 25 Fig. 4 zeigt, dass für die effiziente Unterdrückung der YFP-
Genexpression die einzelsträngige Ausbildung nicht an beiden
3'-Enden (auf Sinn- und Antisinn-Strang) notwendig ist. Um
eine möglichst effektive Inhibition der YFP-Expression zu er-
reichen, ist lediglich der 2nt-Überhang am 3'-Ende auf dem
30 Antisinn-Strang notwendig. So liegt die Inhibition der YFP-
Expression bei einer Konzentration von 1 nM bei den beiden
dsRNAs S4 (mit 2nt-Überhängen auf beiden 3'-Enden) und
S1A/S4B (mit einem 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des Antisinn-
Stranges) bei ~70%. Befindet sich dagegen der 2nt-Überhang

auf dem 3'-Ende des Sinn-Stranges (und das 3'-Ende des Antisinn-Stranges trägt keinen einzelsträngigen Bereich), so liegt die Inhibition der YFP-Genexpression lediglich bei 50%. Analog ist die Inhibition bei höheren Konzentrationen deutlich besser, wenn mindestens das 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2nt-Überhang trägt.

Eine deutlichere Hemmung der YFP-Expression wird erreicht, wenn der basengepaarte Bereich 21 Nukleotid-Paare statt 22 (S1 und S4), 20 (S13 bzw. S13/14) oder 19 (S7) umfasst (Fig. 5, 6 und 7). So beträgt die Inhibition der YFP-Expression durch S1 (22 Basenpaarungen mit glatten Enden) in einer Konzentration von 5 nM ~40%, während die Inhibition durch S7/S12 (21 Basenpaarungen mit glatten Enden), ebenfalls mit 5 nM bei ~92% liegt. Weist die dsRNA mit 21 Basenpaarungen noch einen 2nt-Überhang am Antisinnstrang-3'-Ende (S7/S11) auf, so liegt die Inhibition bei ~97% (verglichen mit ~73% Inhibition durch S4 und ~70% Inhibition durch S7).

20

III. Untersuchung der Serumstabilität der doppelsträngigen RNA (dsRNA):

Ziel ist es, die in den Zellkulturen gefundene Effektivität der durch dsRNAs vermittelten Hemmung der Genexpression von Zielgenen für den Einsatz *in vivo* zu steigern. Dies wird durch eine verbesserte Stabilität der dsRNAs im Serum und durch eine daraus resultierende verlängerte Verweilzeit des Moleküls im Kreislauf bzw. die damit verbundenen erhöhte-wirksame- Konzentration des funktionellen Moleküls erreicht.

Ausführungsbeispiel:

Die Serumstabilität der die GFP-Expression hemmenden dsRNAs wurde ex vivo in murinem und humanem Serum getestet.

Versuchsprotokoll:

5

Die Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum mit der entsprechenden dsRNA erfolgte bei 37°C. Es wurden je 85 µl Serum mit 15 µl 100µM dsRNA inkubiert. Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) wurden die Proben
10 bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurde dsRNA ohne Serum (+85 µl ddH₂O) und dsRNA mit Serum zum Zeitpunkt 0 verwendet.

Für die Isolierung der dsRNA aus dem Inkubationsansatz, die auf Eis erfolgte, wurden jeweils 400 µl 0,1% SDS zu den An-
15 sätzen gegeben und diese einer Phenolextraktion unterzogen: Pro Ansatz wurden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (IAA, 25:24:1, Roti[®]-Phenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 30 sec auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie-2; Scientific Industries). Nach 10minütiger Inkubation auf Eis
20 erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C, für 10 min (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). Die obere wässrige Phase (ca. 200 µl) wurde abgenommen und zuerst einem DNase I- und danach einem Proteinase K - Verdau unterzogen: Zugabe von 20 µl 10xfach DNaseI-Puffer (100 mM Tris,
25 pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) und 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min Inkubation bei 37°C, erneute Zugabe von 6 U DNase I und Inkubation für weitere 20 min bei 37°C, Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peqlab, Deutschland) und 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde ei-
30 ne Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde 500 µl Phenol : Chloroform : IAA (25:24:1) zugegeben, 30 sec auf höchster Stufe gevortext, 10 min bei 12.000xg, 4°C, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nacheinander mit 40 µl 3 M Na-Ac (Natriumacetat), pH 5,2, und 1 ml 100% EtOH versetzt, dazwi-

- schen gut gemischt und für mindestens 1 h bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei $12.000\times g$ für 30 min und 4°C pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, $12.000\times g$, 4°C). Das luftgetrocknete
- 5 Pellet wurde in 30 μl RNA-Gelauftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 x TBE (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,02% (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.
- 10 Zur Charakterisierung der dsRNA wurde eine analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (analytische PAGE) durchgeführt. Die Harnstoffgele wurden kurz vor dem Lauf hergestellt: 7M Harnstoff (21g) wurde in 25 ml 40% wässrige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese-Gel, A515.1,
- 15 Roth) und 5 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA pro L Aqua dest.) unter Rühren gelöst und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Kurz vor dem Gießen wurden 50 μl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und 500 μl 10% APS (Ammoniumperoxidisulfat) zugesetzt. Nach dem Auspolymerisieren
- 20 wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur (Merck, Darmstadt) eingesetzt und ein Vorlauf für 30 min bei konstant 40 mA Stromstärke durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die RNA-Proben für 5 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt
- 25 und für 20 sec in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, minispin) abzentrifugiert. Es wurden je 15 μl auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für ca. 2h bei einem konstanten Stromfluß von 40 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min bei RT (Raumtemperatur) mit Stains all-Färbelösung (20 ml Stains all
- 30 Stammlösung (200 mg Stains all in 200 ml Formamid gelöst) mit 200 ml Aqua dest. und 180 ml Formamid versetzt) gefärbt und die Hintergrundfärbung danach durch Spülen in Aqua dest. für 45 min entfernt. Die Gele wurden mit dem Photodokumentationssystem Image Master VDS von Pharmacia photographiert.

Die Fig. 10 bis 17 zeigen die Serumstabilität der dsRNA nach Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum und nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung im 20%igem 7M Harnstoffgel.

5 **Fig. 10: Inkubation von S1 (0-22-0) in Maus-Serum**

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. zum Zeitpunkt 0
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
- 10 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 12 Stunden
8. 2 μ l 100 μ M S1 ohne Inkubation
- S1A) Sinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1A)
- 15 S1B) Antisinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1B)

Fig. 11: Inkubation von S1 (0-22-0) in humanem Serum

1. 2 μ l 100 μ M S1 unbehandelt (ohne Inkubation)
2. für 30 Minuten
3. für 2 Stunden
- 20 4. für 4 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 8 Stunden
7. für 12 Stunden
8. für 24 Stunden
- 25 S1A) Sinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1A)
- S1B) Antisinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1B)

Fig. 12: Inkubation von S7 (2-19-2) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 30 Minuten
- 30 3. für 4 Stunden
4. für 12 Stunden

Fig. 13: Inkubation von S7 (2-19-2) in humanem Serum

1. Sinnstrang S7 (10 μ l 20 μ M S7A)

2. Antisinnstrang S7 (10 μ l 20 μ M S7B)
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
5. für 2 Stunden
- 5 6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 12 Stunden
9. für 24 Stunden
10. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)

10 **Fig. 14: Inkubation von K3 (2-19-2) in Maus-Serum**

1. Sinnstrang K3 (10 μ l 20 μ M K3A)
2. Antisinnstrang K3 (10 μ l 20 μ M K3B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. zum Zeitpunkt 0 (mit Serum)
- 15 5. für 30 Minuten
6. für 1 Stunde
7. für 2 Stunden
8. für 4 Stunden
9. für 12 Stunden

20 **Fig. 15: Inkubation von PKC1/2 (0-22-2) in Maus-Serum**

1. für 30 Minuten
2. für 1 Stunde
3. für 2 Stunden
4. für 4 Stunden
- 25 5. für 12 Stunden
6. 2 μ l 100 μ M PKC1/2 (unbehandelt)

Fig. 16: Inkubation von S1A/S4B (0-22-2) in humanem Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 24 Stunden
- 30 3. für 12 Stunden
4. für 8 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 4 Stunden

7. für 2 Stunden
8. für 30 Minuten
9. Sinnstrang S1A (10 μ l 20 μ M S1A)
10. Antisinnstrang S4B (10 μ l 20 μ M S4B)

5 Fig. 17: Inkubation von K2 (2-22-2) in humanem Serum

1. Sinnstrang K2 (10 μ l 20 μ M K2A)
2. Antisinnstrang K2 (10 μ l 20 μ M K2B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. für 30 Minuten
- 10 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 8 Stunden
9. für 12 Stunden
- 15 10. für 24 Stunden

Ergebnisse:

dsRNAs ohne einzelsträngige Bereiche an den 3'-Enden sind im
20 Serum sowohl von Mensch und Maus wesentlich stabiler als
dsRNAs mit einzelsträngigen 2nt-Überhängen an den 3'-Enden
(Fig. 10 bis 14 und 17). Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation
von S1 in murinem bzw. humanem Serum ist noch immer eine Ban-
de in der ursprünglichen Größe fast vollständig erhalten. Da-
25 gegen nimmt bei dsRNAs mit 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden
die Stabilität in humanem als auch im murinen Serum deutlich
ab. Bereits nach 4 Stunden Inkubation von S7 (Fig. 12 und 13)
oder K3 (Fig. 14) ist keine Bande in der Originalgröße mehr
detektierbar.

30

Um die Stabilität von dsRNA im Serum zu erhöhen, ist es aus-
reichend, wenn die dsRNA ein glattes Ende besitzt. Im Maus-
Serum ist nach 4 Stunden Inkubation (Fig. 15, Bahn 4) die

Bande in der Originalgröße kaum abgebaut im Vergleich zu S7 (nach 4 Stunden vollständiger Abbau; Fig. 12, Bahn 3).

- Als optimaler Kompromiß hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit von dsRNA kann die Verwendung von dsRNA mit einem glattem Ende und einem einzelsträngigem Bereich von 2 Nukleotiden angesehen werden, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges befinden sollte.
- 10 Die hier verwendeten Sequenzen sind aus der nachstehenden Tabelle 2 und den Sequenzprotokollen SQ148-151 und 153-167 ersichtlich.

Name	Sequenz- proto- koll-Nr.	dsRNA-Sequenz	
S1	SQ148 SQ149	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-0
S7	SQ150 SQ151	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	2-19-2
K1	SQ153 SQ154	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-0
K3	SQ155 SQ156	(A) 5'- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3' (B) 3'- UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5'	2-19-2
K2	SQ157 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-2
S1A/ S4B	SQ148 SQ159	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-2

PKC 1/2	SQ160 SQ161	(A) 5'- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3' (B) 3'- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5'	2-22-0
S7/S12	SQ150 SQ162	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUU -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	0-21-0
S7/S11	SQ150 SQ163	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	0-21-2
S13	SQ164 SQ165	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	0-20-2
S13/14	SQ164 SQ166	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACU -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	0-20-0
S4	SQ167 SQ159	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUUCUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	2-22-2
K1A/ K2B	SQ153 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-2
K1B/ K2A	SQ154 SQ157	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-0
S1B/ S4A	SQ149 SQ167	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUUCUU -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	2-22-0

Tabelle 2

IV. In vivo-Studie:

5

Es wurde „GFP-Labormäusen“, die das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-Sequenz abgeleitet wurde, bzw. unspezifische dsRNA intravenös in die Schwanzvene injiziert. Am Versuchsende wurden die Tie-

10

re getötet und die GFP-Expression in Gewebeschnitten und im Plasma analysiert.

Versuchsprotokoll:

5

Synthese der dsRNA:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex, verwendet; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung:

Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev. 76: 79-90; Hadjantonakis AK et al., 1998 Nature Genetics 19: 220-222). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den deutschen Tier-
schutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Um-
weltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makro-
lon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten
5 Temperatur von 22°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h
gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15
der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Lei-
tungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Al-
tromin) ad libitum.

10

Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-
Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen wie oben be-
schrieben gehalten. Die Injektionen der dsRNA-Lösung erfolg-
ten intravenös (i.v.) in die Schwanzvene im 12h-Turnus (zwi-
15 schen 5³⁰ und 7⁰⁰ sowie zwischen 17³⁰ und 19⁰⁰ Uhr) über 5 Tage
hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Körperge-
wicht und die Dosis betrug 2,5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg
Körpergewicht. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt:

- 20 Gruppe A: PBS (phosphate buffered saline) je 60 µl pro
 10 g Körpergewicht,
- Gruppe B: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer unspezifi-
 schen Kontroll-dsRNA (K1-Kontrolle mit glatten
25 Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nu-
 kleotidpaaren),
- Gruppe C: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer weiteren un-
 spezifischen Kontroll-dsRNA (K3-Kontrolle mit
30 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden und einem
 Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren),
- Gruppe D: 2,5 mg pro kg Körpergewicht dsRNA (spezifisch
 gegen GFP gerichtet, im weiteren als S1 be-

zeichnet, mit glatten Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nukleotidpaaren),

- 5 Gruppe E: 2,5 mg dsRNA pro kg Körpergewicht (spezifisch gegen GFP gerichtet, im Weiteren als S7 bezeichnet, mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren)
- 10 Gruppe F: 50 µg S1-dsRNA pro kg Körpergewicht (also 1/50 der Dosis der Gruppe D).

15 Nach der letzten Injektion von insgesamt 10 Injektionen wurden die Tiere nach 14-20h getötet und Organe und Blut wie beschrieben entnommen.

Organentnahme:

Sofort nach dem Töten der Tiere durch CO₂-Inhalation wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, 20 Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24h fixiert, ein Teil für 25 Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNAeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme 30 min auf Eis gehalten, gemixt, 30 5 min bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert (hier als Plasma bezeichnet).

Prozessieren der Biopsien:

Nach 24h Fixierung der Gewebe in MC wurden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT (Raumtemperatur) dehydriert: je 40 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe
5 in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica) Gewebeschnitte von 3 µm Schnittdicke
10 angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

Immunperoxidase-Färbung gegen GFP:

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3% H₂O₂/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden im Folgenden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde
20 mit dem 1. Antikörper (goat anti-GFP, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (donkey anti-goat; Santa Cruz Biotechnology; 1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min
25 mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen und Pufferreste mit Zellstoff von den Schnitten entfernt. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA)/PBS verdünnt. Die Färbung mit
30 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit

Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte mit dem IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

5 Proteinisolierung aus Gewebestücken:

Zu den noch gefrorenen Gewebestücken wurden jeweils 800 µl Isolierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% Glycerol; 0,1% Tween; 1 mM DTT; 10 mM β-Glycerol-Phosphat; 1 mM NaF; 0,1 mM Na₃VO₄ mit einer Protease-Inhibitor-Tablette „Complete“ von Roche) zugegeben und
10 2 x 30 Sekunden mit einem Ultraturrax (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Heidolph) homogenisiert, dazwischen auf Eis abgekühlt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde gemischt und für 20 Minuten bei 10.000xg, 4°C, zentrifugiert (3K30,
15 Sigma). Der Überstand wurde erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert, gemischt und 20 Minuten bei 15.000xg, 4°C, zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford, 1976, modifiziert nach Zor & Selinger, 1996, mit dem Roti-Nanoquant-System von Roth nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Protein-Eichgerade wurde BSA
20 (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese:

25 Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke
30 gegossen: 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,4, 150 µl 10% SDS, 3,3 ml Aqua bidest., 250 µl Ammoniumpersulfat (10%), 9 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1%

SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83 µl Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630 µl 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED.

5

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit einer entsprechenden Menge an 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurde die gleichen Plasma- bzw. Proteinmengen eingesetzt (je 3 µl Plasma bzw. 25 µg Gesamtprotein). Die Elektrophorese erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker von Bio-Rad (Kaleidoscope Prestained Standard) verwendet.

Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 1,5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschriffe erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat anti-GFP, sc-5384, San-

ta Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:1000 erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Horseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1 : 10.000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.

In den Fig. 18 bis 20 ist die Inhibition der GFP-Expression nach intravenöser Injektion von spezifisch gegen GFP gerichteter dsRNA mit Immunperoxidase-Färbungen gegen GFP an 3 µm Paraffinschnitten dargestellt. Im Versuchsverlauf wurde gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem doppelsträngigen Bereich von 22 Nukleotid-(nt)paaren ohne Überhänge an den 3'-Enden (D) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (B) sowie spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (E) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (C) im 12 Stunden-Turnus über 5 Tage hinweg appliziert. (F) erhielt 1/50 der Dosis von Gruppe D. Als weitere Kontrolle wurden Tiere ohne dsRNA-Gabe (A) bzw. WT-Tiere untersucht. Die Fig. 18 zeigt die Inhibition der GFP-Expression in Nierenschnitten, Fig. 19 in Herz- und Fig. 20 in Pankreasgewebe. In den Fig. 21 bis 23 sind Western Blot-Analysen der GFP-Expression in Plasma und Geweben dargestellt. In der Fig. 21 ist die Inhibition der GFP-Expression im Plasma, in Fig. 22 in der Niere und in Fig. 23 in Herz gezeigt. In Fig. 23 sind Gesamtproteinisolate aus verschiedenen Tieren aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen pro Bahn aufgetragen. In den Tieren, denen unspezifische Kontroll-dsRNA verabreicht wurde (Tiere der Gruppen B und C), ist die GFP-Expression gegenüber Tieren, die keinerlei dsRNA erhielten, nicht reduziert. Tiere, die spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden

beider Stränge und einen 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich erhielten, zeigten eine signifikant inhibierte GFP-Expression in den untersuchten Geweben (Herz, Niere, Pankreas und Blut), verglichen mit unbehandelten Tieren (Fig. 18 bis 23). Bei den Tieren der Gruppen D und F, denen spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit glatten Enden und einem 22 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich appliziert wurde, zeigten nur jene Tiere, die die dsRNA in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht pro Tag erhielten, eine spezifische Inhibition der GFP-Expression, die allerdings weniger deutlich ausgeprägt war als die der Tiere in Gruppe E.

Die zusammenfassende Auswertung von GFP-Inhibition in den Gewebeschnitten und im Western Blot ergibt, dass die Inhibition der GFP-Expression im Blut und in der Niere am stärksten ist (Fig. 18, 21 und 22).

V. Hemmung der Genexpression des EGF-Rezeptors mit dsRNA als therapeutischer Ansatz bei Krebsformen mit EGFR-Überexpression oder EGFR-induzierter Proliferation:

Der Epidermal Growth Factor (=EGF)-Rezeptor (=EGFR) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinase, transmembranen Proteinen mit einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität, die an der Kontrolle einer Reihe von zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierungen, migratorischen Prozessen oder der Zellvitalität beteiligt sind (Übersicht in: Van der Geer et al. 1994). Die Familie der EGFR besteht aus 4 Mitgliedern, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) mit einer transmembranen Domäne, einer cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Die Sequenz des EGFR, einem 170 kDa Protein, ist seit 1984 bekannt (Ullrich et al., 1984).

Aktiviert wird der EGFR durch Peptid-Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF α (transforming growth factor), Amphiregulin, Beta-cellulin, HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) und Neureguline. Ligandenbindung induziert die Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit nachfolgender Autophosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosine (Ullrich & Schlessinger, 1990; Alroy & Yarden, 1997). Die phosphorylierten Aminosäuren bilden die Bindungsstellen für eine Vielzahl von Proteinen, die an den proximalen Schritten der Signalweiterleitung in einem komplexen Netzwerk beteiligt sind. Der EGFR ist an den verschiedensten Tumorerkrankungen beteiligt und damit ein geeignetes Target für therapeutische Ansätze (Huang & Harari, 1999). Die Mechanismen, die zu einer aberranten EGFR-Aktivierung führen, können auf Überexpression, Amplifikation, konstitutiver Aktivierung mutanter Rezeptor-Formen oder autokrinen Loops beruhen (Voldborg et al., 1997). Eine Überexpression des EGFR wurde für eine Reihe von Tumoren beschrieben, wie z.B. Brustkrebs (Walker & Dearing, 1999), Nicht-Klein-Lungenkarzinom (Fontanini et al., 1998), Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom (Salomon et al., 1995) und Glioblastomen (Rieske et al., 1998). Insbesondere für maligne Glioblastome sind bisher keine effizienten und spezifischen Therapeutika verfügbar.

25 Ausführungsbeispiel:

Zum Nachweis der Wirksamkeit der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der EGFR-Genexpression wurden U-87 MG-Zellen (humane Glioblastomzellen), ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 89081402, verwendet, die mit spezifisch gegen den EGF-Rezeptor (Sequenzprotokoll SQ 51) gerichteten dsRNA transfiziert wurden. Nach ca. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, Protein isoliert und im Western Blot Verfahren die EGFR-Expression untersucht.

Versuchsprotokoll:dsRNA-Synthese:

- 5 Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute.
- 10
- 15 Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

20

Aussaat der Zellen:

- Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der U-87 MG-Zellen erfolgte im Brutschrank (CO₂-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom) mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom), 1xNEAA (Non-essential Aminoacids, Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Applikation der dsRNA mittels Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA,
- 25
- 30

Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung in einer 6-Well-Platte (6-Well Schalen, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 1,5 ml Wachstumsmedium ausgesät.

5

Applikation der dsRNA in kultivierte U-87 MG-Zellen:

Die Applikation der dsRNA erfolgte mittels Transfektion mit dem OLIGOFECTAMINE™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug

10 1 ml. Zuerst wurde die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt: Dazu wurden pro Well 0,5 µl einer 20 µM Stammlösung spezifisch gegen EGFR gerichteten dsRNA und 9,5 µl einer 20 µM Stammlösung unspezifischer dsRNA (K1A/K2B) mit 175 µl serumfreiem Medium verdünnt (200 nM dsRNA im Transfektionsansatz

15 bzw. 10 nM spezifische EGFR-dsRNA). Das OLIGOFECTAMINE™ Reagent wurde ebenfalls in serumfreiem Medium verdünnt: pro Well 3 µl mit 12 µl Medium und danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das verdünnte OLIGOFECTAMINE™ Reagent zu den in Medium verdünnten dsRNAs gegeben, gemischt und für

20 weitere 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 1 ml serumfreiem Medium gewaschen und mit 800 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl

25 dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent pro Well wurden die Zellen bis zur Proteinisolierung weiter im Brutschrank inkubiert.

Proteinisolierung:

Ca. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und eine Proteinisolierung durchgeführt. Dazu wurde das

30 Medium abgenommen und das Zellmonolayer 1 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Proteinisolierungspuffer (1x Protease-Inhibitor „Complete“, Roche, 50 mM HEPES, pH 7,5,

150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10% Glyzerin, 0,1% Tween-20, 1 mM DTT, 10 mM β -Glycerinphosphat, 1 mM NaF, 0,1 mM Na_3VO_4) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, 10 min auf Eis inkubiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C für mindestens 30 min gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat für 10 sec mit einem Dispergierer (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Hei-

5 dolph-Instruments GmbH & Co KG, Schwabach) auf Stufe 3 homogenisiert, für 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei

10 14.000xg, 4°C (3K30, Sigma) zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Roti®-Nanoquant-System von Roth (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden je 200 μl Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 800 μl 1x Arbeits-

15 lösung gemischt und die Extinktion in Halbmikroküvetten bei 450 und 590 nm gegen Aqua dest. in einem Beckman-Spektralphotometer (DU 250) gemessen. Für die Eichgerade wurden entsprechende BSA-Verdünnungen verwendet (perliertes BSA, Sigma).

20

SDS-Gelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 7,5% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke gegossen: 3,75 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,4, 150 μl 10% SDS, 7,15 ml Aqua bi-

25 dest., 150 μl Ammoniumpersulfat (10%), 9 μl TEMED (N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630 μl 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% Ammonium-

30 persulfat, 5 μl TEMED.

Für den Auftrag auf das Gel wurden die Proteinproben 1:3 mit 4x Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurden 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Gelauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längensstandard wurde der Kaleidoskop-Proteingelmarker (BioRad)) verwendet.

Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA/cm² für 1,5 h. Als Transferpuffer wurden verwendet: Kathodenpuffer (30 mM Tris, 40 mM Glycin, 10% Methanol, 0,01% SDS; pH 9,4), Anodenpuffer I (300 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol) und Anodenpuffer II (30 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol). Vor dem Zusammensetzen des Blotstapels mit 3MM Whatman-Papier (Schleicher & Schüll) wurden das Gel in Kathodenpuffer und die PVDF-Membran (zuvor 30 sec in 100% Methanol) in Anodenpuffer II inkubiert (5 min): 2 Lagen 3MM-Papier (Anodenpuffer I), 1 Lage 3MM-Papier (Anodenpuffer II), PVDF-Membran, Gel, 3 Lagen 3MM-Papier (Kathodenpuffer). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig).

Die Blotmembran wurde nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS/0,1% Tween-20 für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nach-

folgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (human EGFR extracellular domain, specific goat IgG, Cat-Nr. AF231, R&D Systems) erfolgte auf einem Schüttler für 2h bei RT in einer Konzentration von 1,5 µg/ml. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Horseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert (1:10.000 verdünnt). Nach dem Waschen (3 x 3min in PBS/0,1% Tween-20) erfolgte sofort die Detektion mittels ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence): Zu 18 ml Aqua dest. wurden 200 µl Lösung A (250 mM Luminol, Roth, gelöst in DMSO), 89 µl Lösung B (90 mM p-Coumarsäure, Sigma, gelöst in DMSO) und 2 ml 30% H₂O₂-Lösung pipettiert. Je nach Membrangröße wurden 4-6 ml direkt auf die Membran pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und danach sofort ein Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) aufgelegt.

Die hier verwendeten Sequenzen sind in der nachstehenden Tabelle 3 sowie in den Sequenzprotokollen SQ153, 157, 158, 168-173 wiedergegeben.

ES-7	SQ168	(A) 5'- AACACCGCAGCAUGUCAAGAU -3'	2-19-2
	SQ169	(B) 3'- UUUUGUGGCGUCGUACAGUUC -5'	
ES-8	SQ170	(A) 5'- AAGUUAAAAUCCCGUCGCUAU -3'	2⁵-19-2⁵
	SQ171	(B) 3'- CAAUUUUAAGGGCAGCGAUAGU -5'	
ES2A/ ES5B	SQ172	(A) 5'- AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAA -3'	0-22-2
	SQ173	(B) 3'- UUUCACACUAGGUUCGACAGGGUU -5'	
K2	SQ157	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3'	2-22-2
	SQ158	(B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	

K1A/ K2B	SQ153	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA	-3'	0-22-2
	SQ158	(B)	3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU	-5'	

Tabelle 3

Inhibition der EGFR-Expression in U-87 MG Glioblastom-Zellen:

5 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit 10 nM dsRNA wie angegeben (Oligofectamine) transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und Protein isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 7,5% SDS-PAGE. Pro Bahn wurden je 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. In Fig. 24 ist die

10 entsprechende Western Blot-Analyse gezeigt, aus der hervorgeht, dass sich mit der spezifisch gegen das EGFR-Gen gerichteten dsRNA mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Strangs die EGFR-Expression nach Transfektion in U-87 MG-Zellen signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen

15 inhibieren lässt. Diese Inhibition der Expression eines endogenen Gens durch spezifische dsRNA bestätigt somit die in Ausführungsbeispiel II angeführten Ergebnisse zur Inhibition der Expression eines nach transienter Transfektion in die Zelle eingebrachten artifiziellen Gens. Die durch ES-7 bzw.

20 ES-8 vermittelte Inhibition der EGFR-Expression ist deutlich geringer. Die in Fig. 24 verwendeten dsRNAs sind Tabelle 3 zu entnehmen.

25 VI. Hemmung der Expression des Multidrug resistance Gens 1 (MDR1):

Versuchsprotokoll:

Der *in vitro* Nachweis für das Blockieren der MDR1-Expression

30 wurde in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T (ATCC - American Type Culture Collection; Tom et al., 1976) durchgeführt. Von

dieser Zelllinie ist bekannt, daß die Expression von MDR1 durch Zugabe von Rifampicin zum Kulturmedium induzierbar ist (Geick et al., 2001). Transfektionen wurden mit verschiedenen käuflichen Transfektions-Kits (Lipofectamine, Oligofectamine, beide Invitrogen; TransMessenger, Qiagen) durchgeführt, wobei
 5 der TransMessenger Transfektions-Kit sich als für diese Zelllinie am geeignetsten herausstellte.

Zur Durchführung der RNA-Interferenz-Experimente wurden 4
 10 kurze doppelsträngige Ribonukleinsäuren R1-R4 eingesetzt, deren Sequenzen in Tabelle 4) gezeigt sind. Die Ribonukleinsäuren sind mit Abschnitten der kodierenden Sequenz von MDR1 (Sequenzprotokoll SQ 30) homolog. Die Sequenzen R1 - R3 bestehen aus einem 22-mer Sinn- und einem 24-mer Antisinn-Strang, wobei der entstehende Doppelstrang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2-Nukleotid-Überhang aufweist (0-22-2). Die
 15 Sequenz R4 entspricht R1, jedoch besteht sie aus einem 19-mer Doppelstrang mit je 2-Nukleotid-Überhängen an jedem 3'-Ende (2-19-2).

20

<u>Name</u>	<u>Sequenz- proto- koll-Nr.</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Position in Daten- bank-# AF016535</u>
Seq R1	SQ141 SQ142	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG A-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA UUC U-5'	1320-1342 1335-1318
Seq R2	SQ143 SQ152	5' - UAU AGG UUC CAG GCU UGC UGU A-3' 3' -CG AUA UCC AAG GUC CGA ACG ACA U-5'	2599-2621 2621-2597
Seq R3	SQ144 SQ145	5' - CCA GAG AAG GCC GCA CCU GCA U-3' 3' -UC GGU CUC UUC CGG CGU GGA CGU A-5'	3778-3799 3799-3776
Seq R4	SQ146 SQ147	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA U -5'	1320-1341 1339-1318

			<u>Position in</u> <u>Daten-</u> <u>bank-#</u> <u>AF402779</u>
K1A/	SQ153	5' - ACA GGA UGA GGA UCG UUU CGC A-3'	2829-2808
K2B	SQ158	3' -UC UGU CCU ACU CCU AGC AAA GCG U-5'	2808-2831

Tabelle 4

Die in Tabelle 4 gezeigten Sequenzen sind nochmals im Sequenzprotokoll als Sequenzen SQ141-147, 152, 153, 158 wieder-
5 gegeben. Die dsRNAs wurden in einer Konzentration von 175 nM jeweils als doppelte Ansätze in die Zellen transfiziert, welche am Tag zuvor in 12-Loch-Platten à 3,8 x 10⁵ Zellen/Vertiefung ausgesät wurden. Dazu wurden pro Transfektionsansatz 93,3 µl EC-R-Puffer (TransMessenger Kit, Qiagen,
10 Hilden) mit 3,2 µl Enhancer-R vermischt und danach 3,5 µl der jeweiligen 20 µM dsRNA zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 6 µl TransMessenger Transfection Reagent wurden die Transfektionsansätze 10 Sekunden kräftig gemischt und 10 Minuten bei
15 Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und 200 µl frisches Medium ohne FCS pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der 10-
20 minütigen Inkubationszeit wurden je 100 µl FCS-freies Medium zu den Transfektionsansätzen pipettiert, gemischt, und die Mischung tropfenweise zu den Zellen pipettiert (die dsRNA-Konzentration von 175 µM bezieht sich auf 400 µl Medium Gesamtvolumen). Die dsRNA/Trans-Messenger-Komplexe wurden 4
25 Stunden bei 37°C mit den Zellen in FCS-freiem Medium inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das frische Medium 10 µM Rifampicin und 10% FCS enthielt. Als

Kontrolle wurde eine unspezifische dsRNA-Sequenz, die keinerlei Homologie mit der MDR1-Gensequenz aufweist, eingesetzt (K) und eine MOCK-Transfektion durchgeführt, die alle Reagenzien außer dsRNA enthielt.

5

Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen extrahiert. 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe wurden auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit 5'-α³²P-dCTP random-markierten, spezifischen Sonden zuerst gegen MDR1 und nach dem Strippen des Blots gegen GAPDH als interne Kontrolle hybridisiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

15 Die Röntgenfilme wurden digitalisiert (Image Master, VDS Pharmacia) und mit der Image-Quant-Software quantifiziert. Dabei wurde ein Abgleich der MDR1-spezifischen Banden mit den entsprechenden GAPDH-Banden durchgeführt.

20 Ergebnisse:

Die Fig. 25 und 26 zeigen Northern-Blots (Fig. 25a, 26a) mit quantitativer Auswertung der MDR1-spezifischen Banden nach Abgleich mit den entsprechenden GAPDH-Werten (Fig. 25b, 26b). Es konnte eine Reduktion der MDR1-mRNA um bis zu 55 % im Vergleich zur MOCK-Transfektion und um bis zu 45 % im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-Transfektion beobachtet werden. Nach 48 h ist eine signifikante Reduktion des MDR1-mRNA-Niveaus mit den als R1, R2, R3 (Tabelle 4) bezeichneten dsRNA-Konstrukten erreicht worden. Mit den R4-dsRNA-Konstrukten wurde nach 48 h keine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollen beobachtet (Fig. 26a und 26b). Nach 74 h war eine deutlich stärkere Reduktion des MDR1-mRNA-Levels mit R1, R2 und R3 gegenüber den Kontrollen im Vergleich zu den 48 h-Werten zu beobachten (Fig. 25a und 25b).

- Mit R4 konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine signifikante Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus erzielt werden. Somit reduzieren die Konstrukte mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinnstrangs und einem doppelsträngigen Bereich aus 22 Nukleotidpaaren, relativ unabhängig von dem jeweiligen zum MDR1-Gen homologen Sequenzbereich (nach 48 h; Fig. 26b) das MDR1-mRNA-Level effizienter als die Konstrukte mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge (Antisinn- und Sinnstrang) und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren. Die Ergebnisse bekräftigen damit die in Ausführungsbeispiel IV beschriebene Inhibition der EGFR-Genexpression durch spezifische dsRNAs nach Transfektion in U-87 MG-Zellen.
- Die Transfektionseffizienz wurde in einem getrennten Experiment mit Hilfe eines Texas-Red-markierten DNA-Oligonukleotids (TexRed-A(GATC)₅T; ebenfalls 175 nM transfiziert) ermittelt (Fig. 27a, 27b; 400fache Vergrößerung, 48h nach Transfektion). Sie betrug etwa 50% auf der Grundlage der rot fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Berücksichtigt man die Transfektionsrate der Zellen von etwa 50%, so liegt die beobachtete Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus um ca. 45-55% liegt (verglichen mit den Kontrollen), den Schluss nahe, dass in allen Zellen, die mit spezifischer dsRNA erfolgreich transfiziert werden konnten, die MDR1-mRNA nahezu vollständig und spezifisch abgebaut wurde.

Literatur:

- Alroy I & Yarden Y (1997): The Erb signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letters 410: 83-86.
- Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.
- Bosher, J.M. and Labouesse, M., 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nature Cell Biology 2, E31-E36.
- Bradford MM (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R.A., 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 252, 95-105.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maelhama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6499-6503.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G & Slamon DJ (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that

has progressed after chemotherapy for metastatic disease.
Journal of Clinical Oncology 17: 2639-2648.

5 Ding, S.W., 2000. RNA silencing. Curr. Opin. Biotechnol. 11,
152-156.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E.,
and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interfer-
ence by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature
10 391, 806-811.

Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet.
15, 358-363.

15 Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruth-
ers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H., 1986. Improved free-
energy parameters for prediction of RNA duplex stability.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377 .

20 Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001). Nuclear receptor
response elements mediate induction of intestinal MDR1 by ri-
fampin. J. Biol. Chem. 276 (18), 14581-14587.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M,
25 Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR,
Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G & Ciardiello F (1998):
Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors
and receptors and of neoangiogenesis in completely resected
stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and mi-
30 crovessel count are independent prognostic factors of sur-
vival. Clinical Cancer Research 4: 241-249.

- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- 5 Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell*, 82, 693-696.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1993): Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76: 79-90.
- 10 Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1998): Non-invasive sexing of preimplantation mammalian embryos. *Nature Genetics* 19: 220-222.
- 15 Kyhse-Anderson J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-210.
- 20 Lämmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 25 Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.
- Huang SM & Harari PM (1999): Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Investigational New Drugs* 17: 259-269.
- 30 Limmer, S., Hofmann, H.-P., Ott, G., and Sprinzl, M., 1993. The 3'-terminal end (NCCA) of tRNA determines the structure and

stability of the aminoacyl acceptor stem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 , 6199-6202.

Montgomery, M.K. and Fire, A., 1998. Double-stranded RNA as a
5 mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. Trends Genet. 14, 255-258.

Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A., 1998. RNA as a target of
double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502-
10 15507.

Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Bienhat W
& Liberski PP (1998): A comparative study of epidermal growth
15 factor (EGFR) and mdm2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. Polish Journal of Pathology 49: 145-149.

Robert, J. (1999). Multidrug resistance in oncology: diagnostic
20 and therapeutic approaches. Europ J Clin Invest 29, 536-545.

Stavrovskaya, A.A. (2000) Biochemistry (Moscow) 65 (1), 95-
106.

25 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F & Normanno N (1995): Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies: Critical Reviews in Oncology and Haematology 19: 183-232.

30 Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), In vitro, 12, 180-191.

- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41, 1967-72.
- 5
- Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K., 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett.* 479, 79-82.
- 10
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Liebermann TA, Schlessinger J et al. (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequences and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.
- 15
- Ullrich A & Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.
- 20
- Van der Geer P, Hunter T & Linberg RA (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annual review in *Cell Biology* 10: 251-337.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M & Poulsen HS
- 25 (1997): Epidermal growth factor Receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8: 1197-1206.
- Walker RA & Dearing SJ (1999): Expression of epidermal growth
- 30 factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment* 53: 167-176.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P., 2000.
RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage
of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33.

- 5 Zor T & Selinger Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal. Biochem. 236: 302-308.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:
- 5 Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,
- 10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,
- 15 und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vor-
hergehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des
10 Zielgens ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-
15 tidpaaren aufweist/en.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise
überlappen oder aneinander grenzen.
20
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standet sind.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.
- 30 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,
Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-

ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 das Zielgen das MDR1-Gens ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen
SQ141 - 173 verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt
15 wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmö-
dien, exprimiert wird.
20

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-
iert sind.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.
- 5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
10
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-
15 Gruppen gebildet wird.
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
20
31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
- 25 32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
30
33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 5 35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 15 37. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 20 38. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
- 25 39. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.
- 30 40. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.
41. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

10

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

15 43. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

20

45. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

25 46. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen
30 Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

47. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

49. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

50. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

51. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gens ist.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 5 55. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
56. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
57. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 15 58. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
59. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert
20 sind.
60. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
25
61. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische
30 Verknüpfung erhöht wird.
62. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

63. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die
5 chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

64. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die
10 chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

65. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die
15 chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

66. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die
20 chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

67. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

68. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur
25 Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

69. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die
30 chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.

70. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 5 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
72. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die
10 dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
- 15 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
74. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das
Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-
20 Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
75. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei
Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem
Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kap-
25 sidartigen Gebildes gewandt ist.
76. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der
eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder pro-
zessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
30
77. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die
Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

78. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

79. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 80. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 81. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30

82. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

83. Medikament nach Anspruch 81 oder 82, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.
84. Medikament nach Anspruch 83, wobei das glatte Ende (E1,
5 E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.
85. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.
- 10 86. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 85, enthaltend zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 81 bis 85 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II), wobei der eine Strang (as1) oder
15 zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.
- 20 87. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.
- 25 88. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 87, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.
- 30 89. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 88, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.
90. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

91. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

92. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 -173 verwendet wird.

93. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

94. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

95. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

96. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

97. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

98. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.
- 5 99. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 10 100. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.
- 15 101. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet
- 20 ist.
102. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.
- 25 103. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder
- 30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.
104. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

105. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet ist.

- 5 106. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.

107. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei
10 zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

15 108. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.

20 109. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.

25 110. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.

30 111. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

112. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

113. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

114. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem
10 Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

115. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
15

116. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
20

117. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

25 118. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

119. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

120. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar ist.

121. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

5

Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

15

und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

20 122. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

25 123. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

124. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

30 125. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

126. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vor-
hergehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des
10 Zielgens ist.

127. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-
15 tidpaaren aufweist/en.

128. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise
überlappen oder aneinander grenzen.
20

129. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standet sind.

25 130. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

131. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,
30 Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-

ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

132. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 das Zielgen das MDR1-Gens ist.

133. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen
SQ141 - 173 verwendet wird.

134. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt
15 wird.

135. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmo-
dien, exprimiert wird.
20

136. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

137. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

138. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

139. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-
iert sind.

140. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

141. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

142. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

143. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

144. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

145. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

146. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

147. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.
- 5 148. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 10 149. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.
- 15 150. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 20 151. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
- 25 152. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
- 30 153. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

154. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 5 155. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 156. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 15 157. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
158. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm
20 Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
159. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen
25 ist.
160. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verab-
30 reicht wird.
161. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

10

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

162. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

15 163. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

164. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

20

165. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

25 166. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen
30 Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

167. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

168. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

169. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

170. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

171. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

172. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gens ist.

173. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

174. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 5 175. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
176. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
177. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 15 178. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
179. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert
20 sind.
180. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
25
181. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische
30 Verknüpfung erhöht wird.
182. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

183. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

184. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

185. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

186. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

187. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

188. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

189. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.

190. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 5 191. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
- 10 192. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
- 15 193. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
194. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-
- 20 Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
195. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 25 196. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 30 197. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

198. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

199. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 200. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 201. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30

202. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

211. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

10

212. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

15

213. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

214. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

20

215. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

25

216. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

217. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30

218. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

- 5 219. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 10 220. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.
- 15 221. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet
20 ist.
222. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.
- 25 223. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder
30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.
224. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

225. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet ist.
- 5 226. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.
227. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei
10 zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 15 228. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 20 229. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
- 25 230. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.
- 30 231. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

232. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

233. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

234. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei
10 bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

235. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei
15 der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

236. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei
20 die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

237. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standet sind.

238. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei
25 die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

239. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

240. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei
die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intrave-

nös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar
ist.

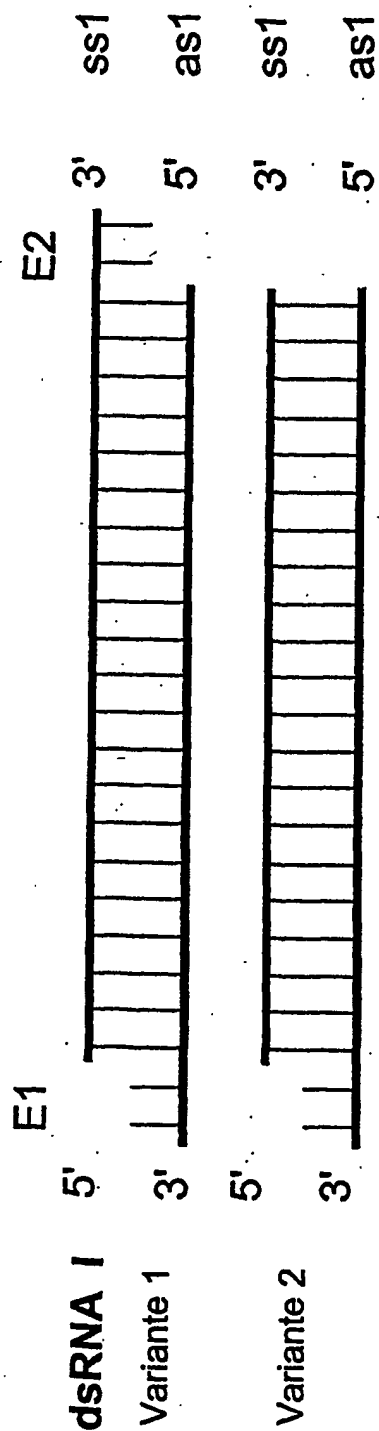


Fig. 1a

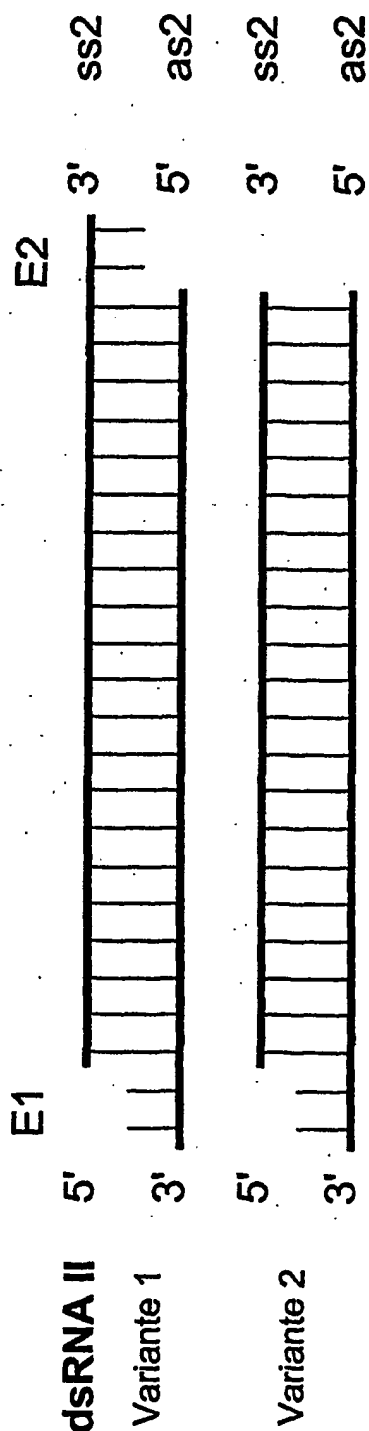


Fig. 1b

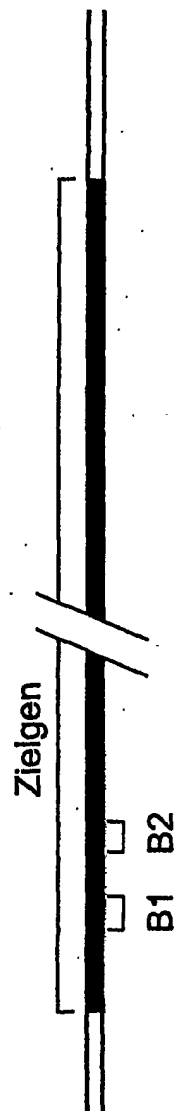


Fig. 2

2/20

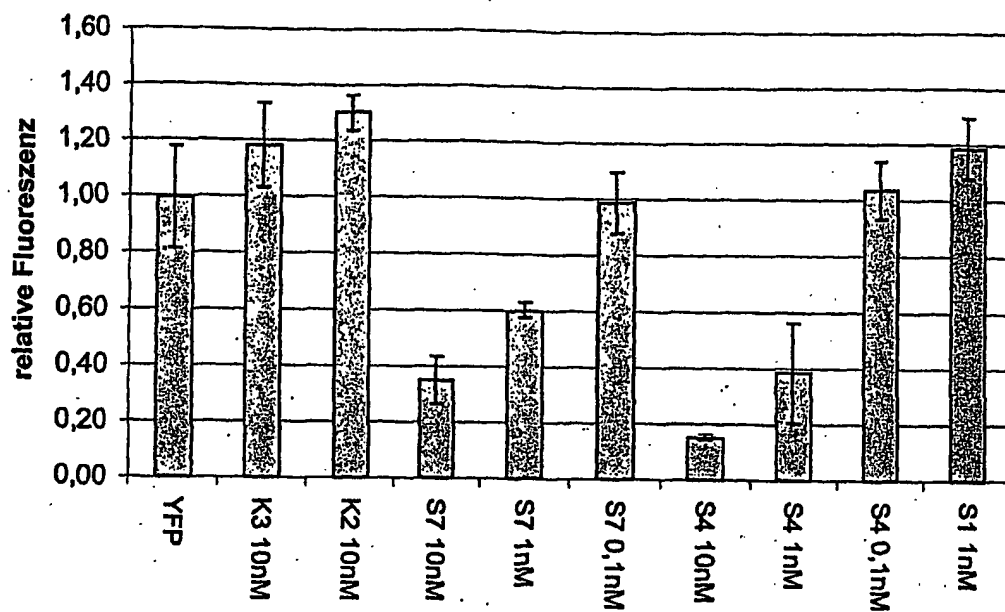


Fig. 3

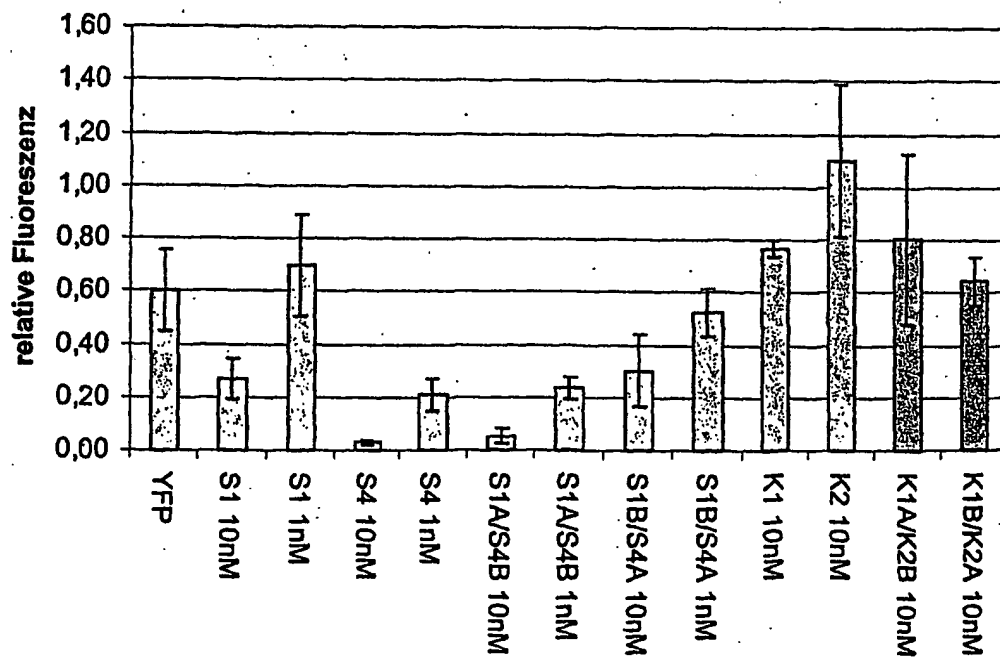


Fig. 4

3/20

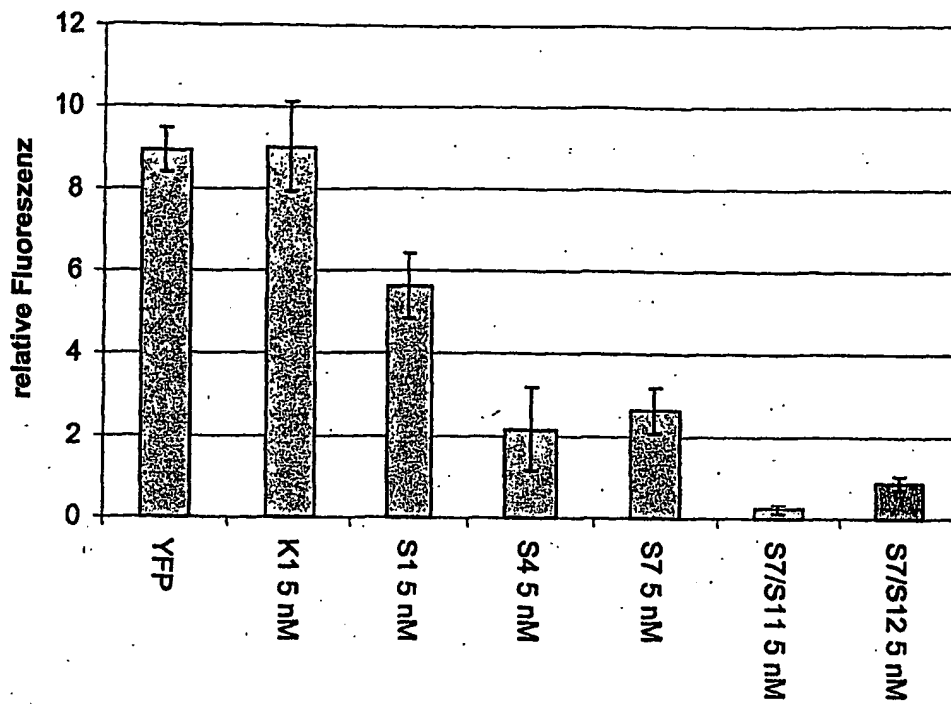


Fig. 5

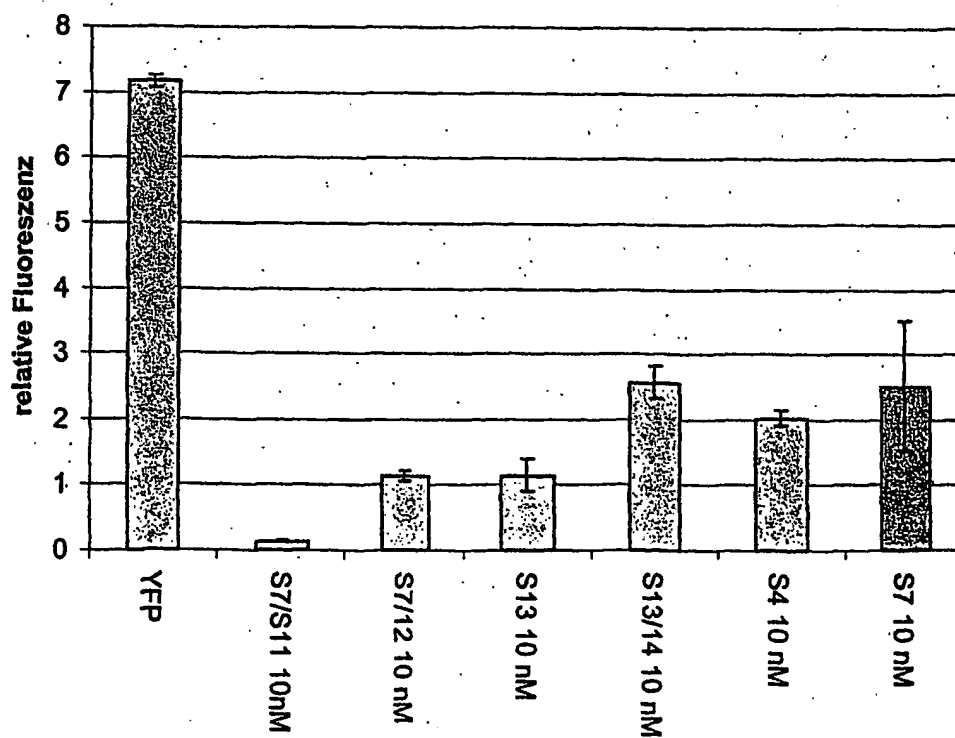


Fig. 6

4/20

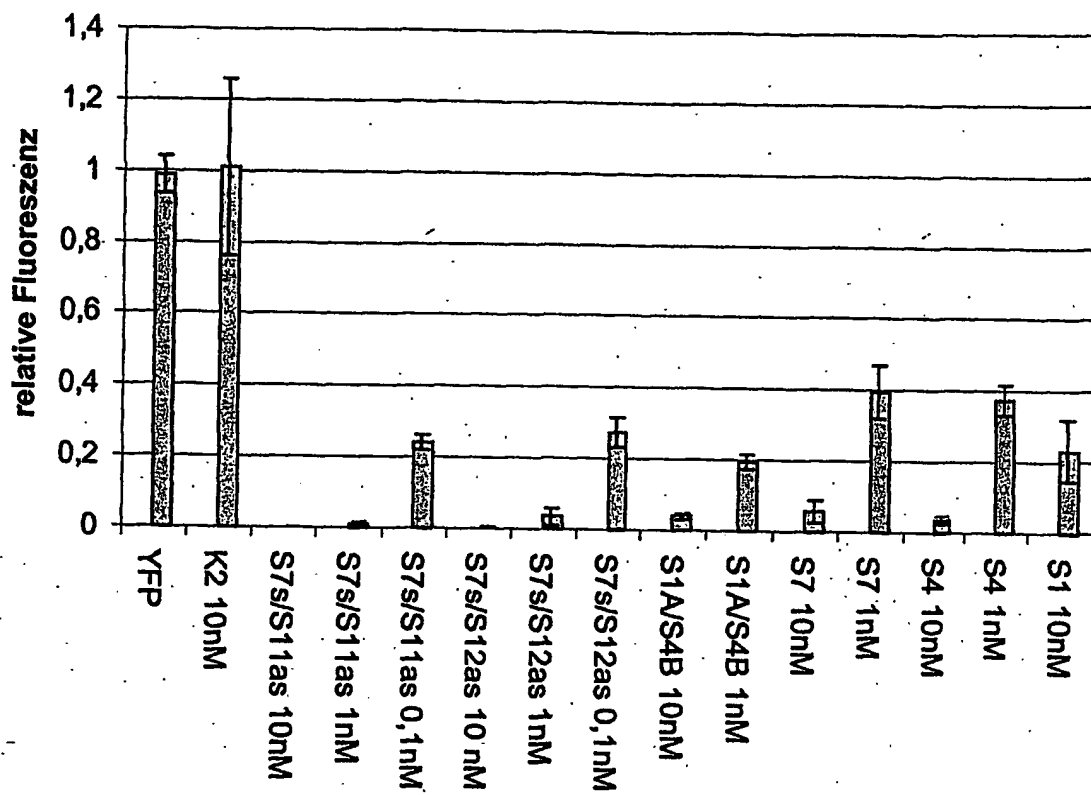


Fig. 7

5/20

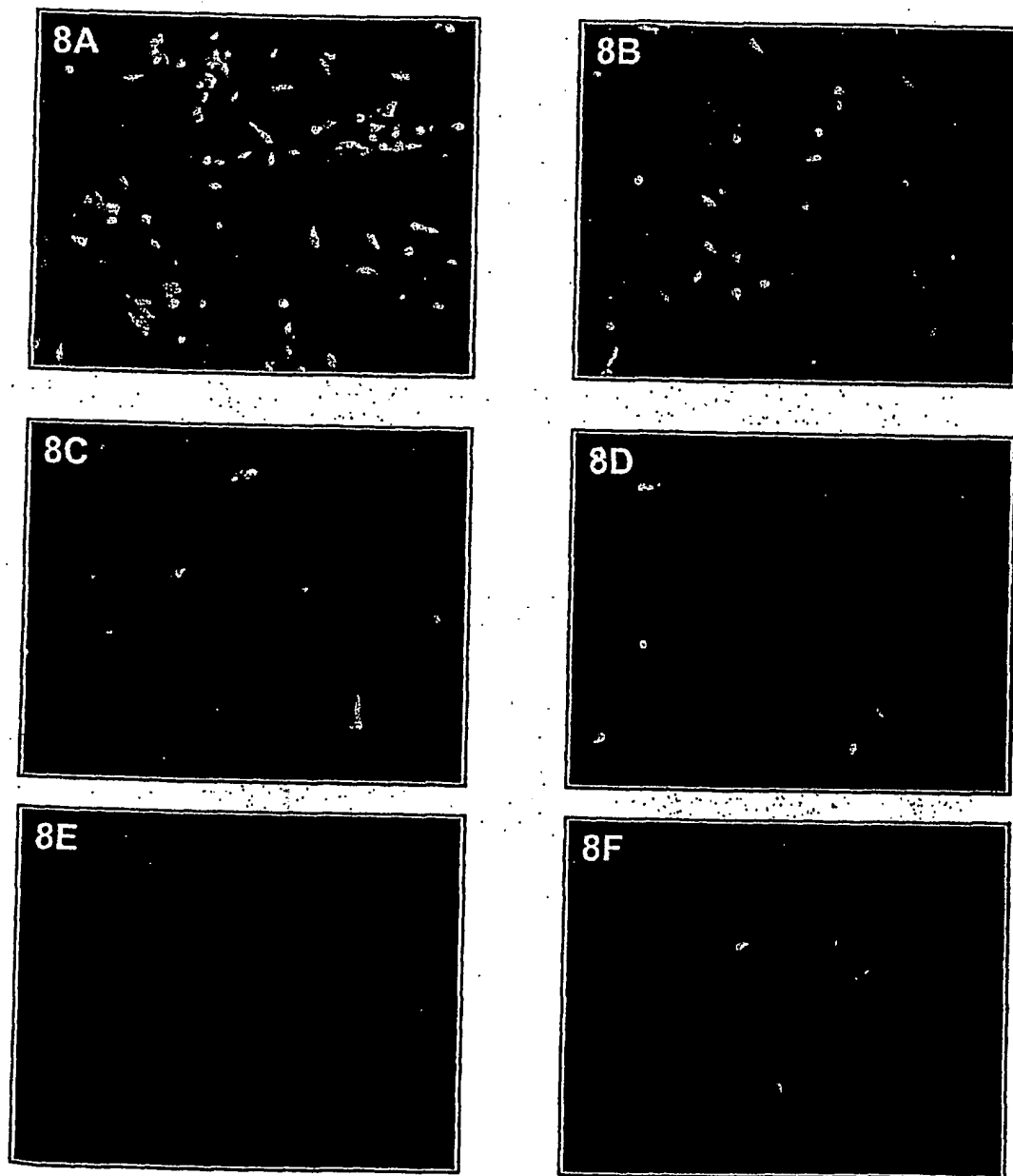


Fig. 8

6/20

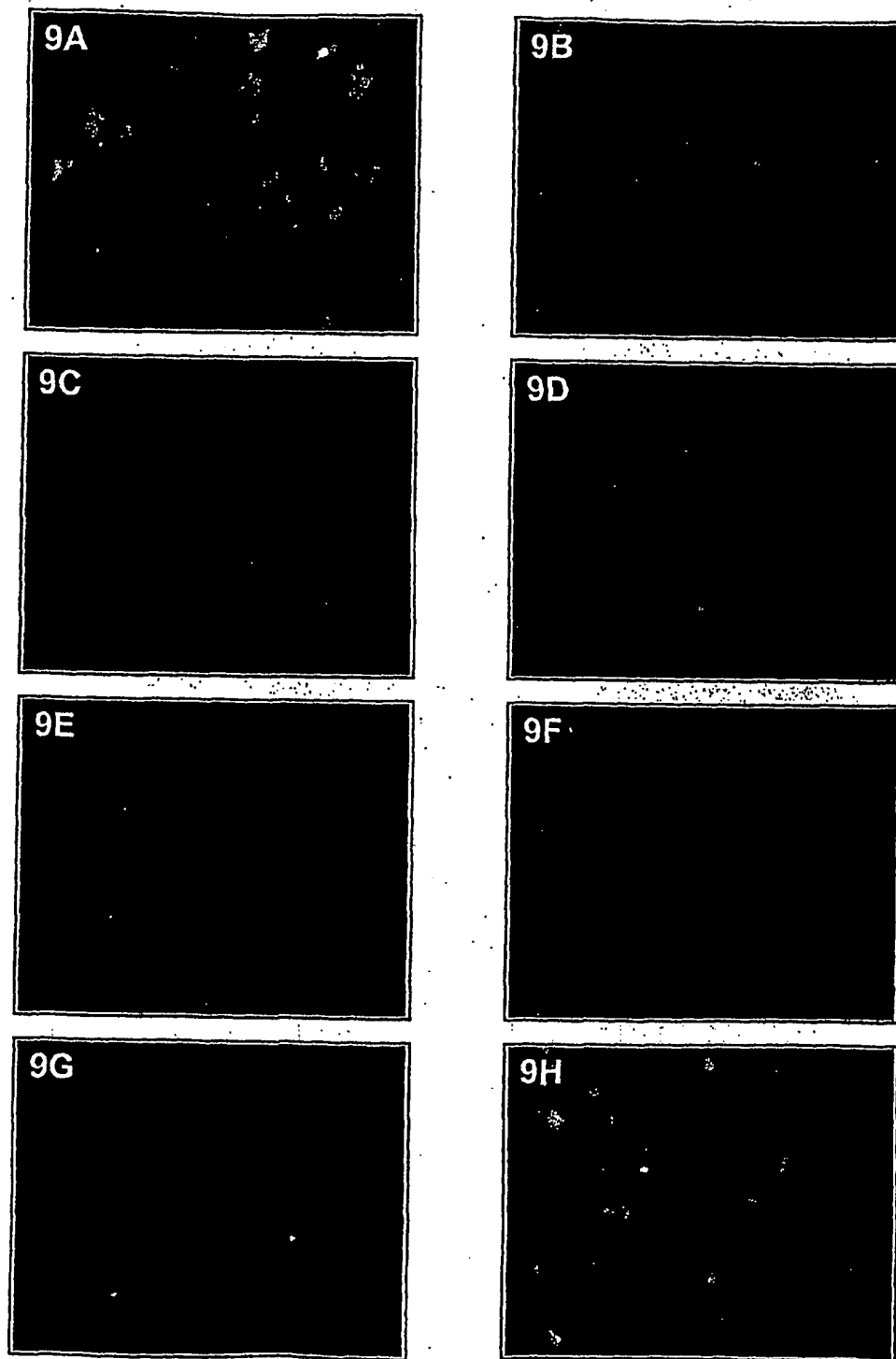


Fig. 9

7/20

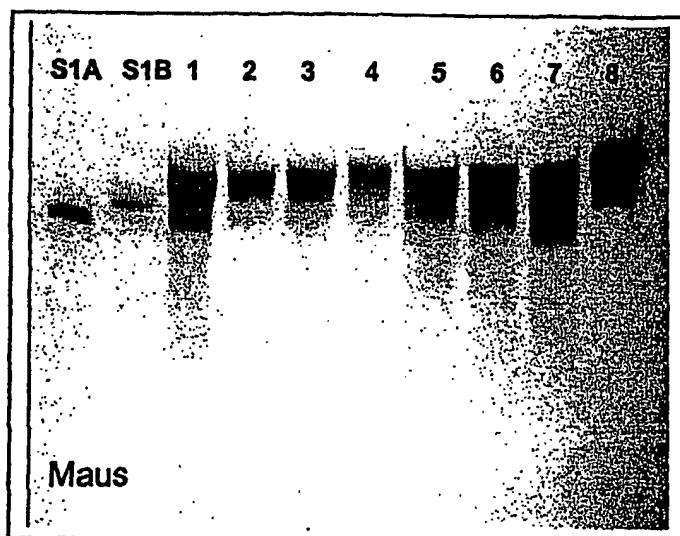


Fig. 10

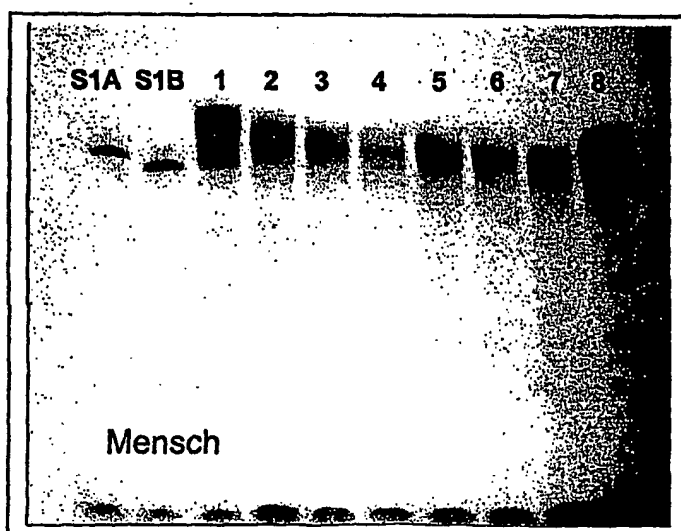


Fig. 11

8/20

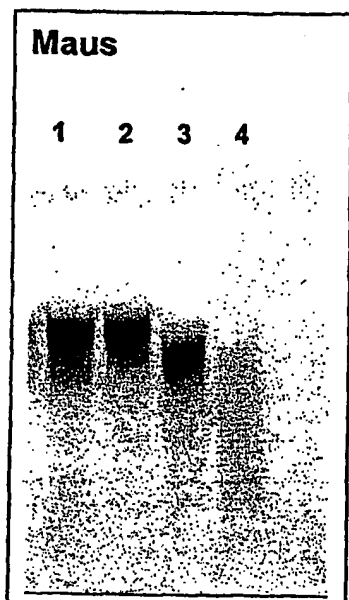


Fig. 12

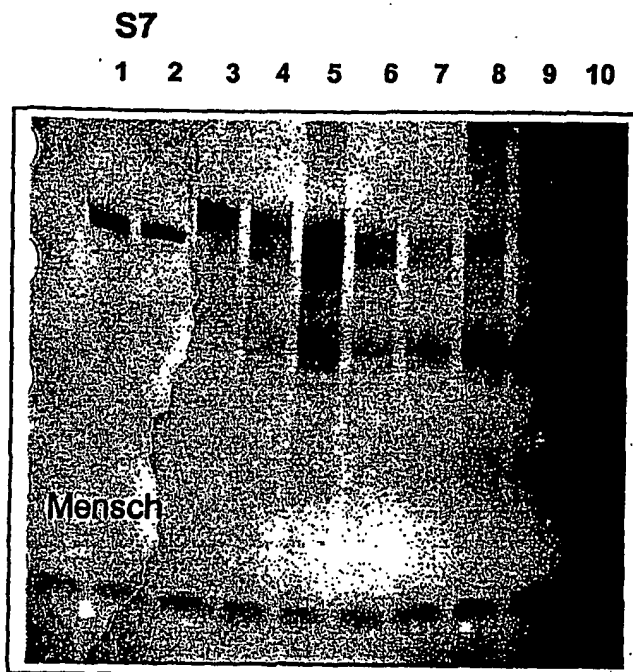


Fig. 13

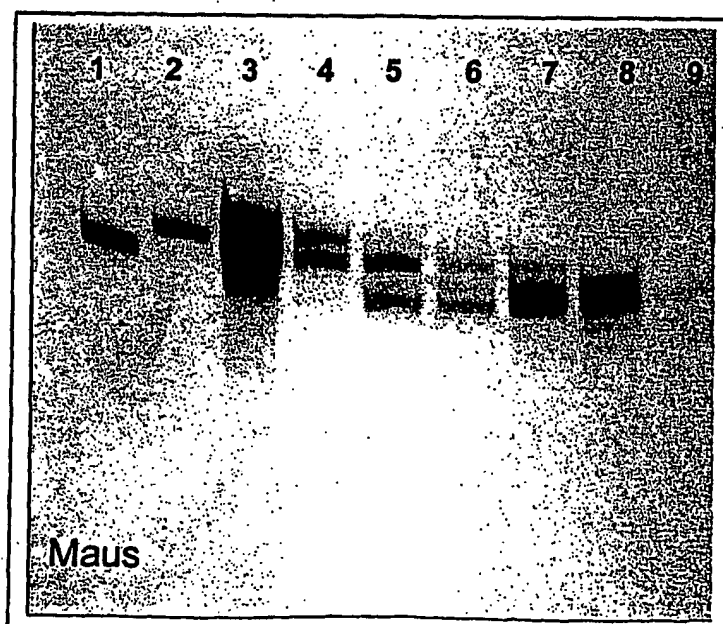


Fig. 14

9/20

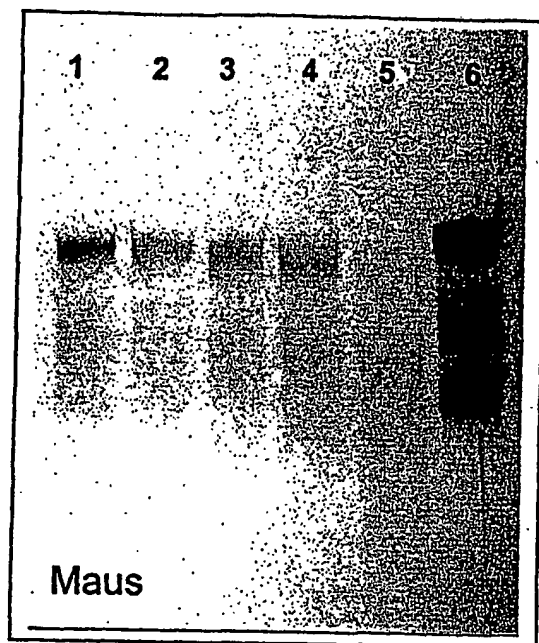


Fig. 15

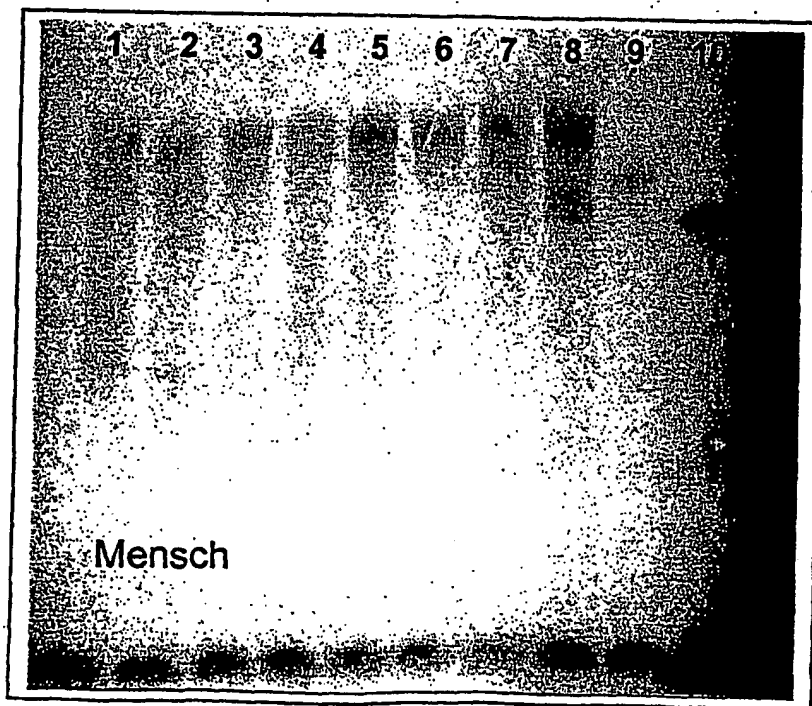


Fig. 16

10/20

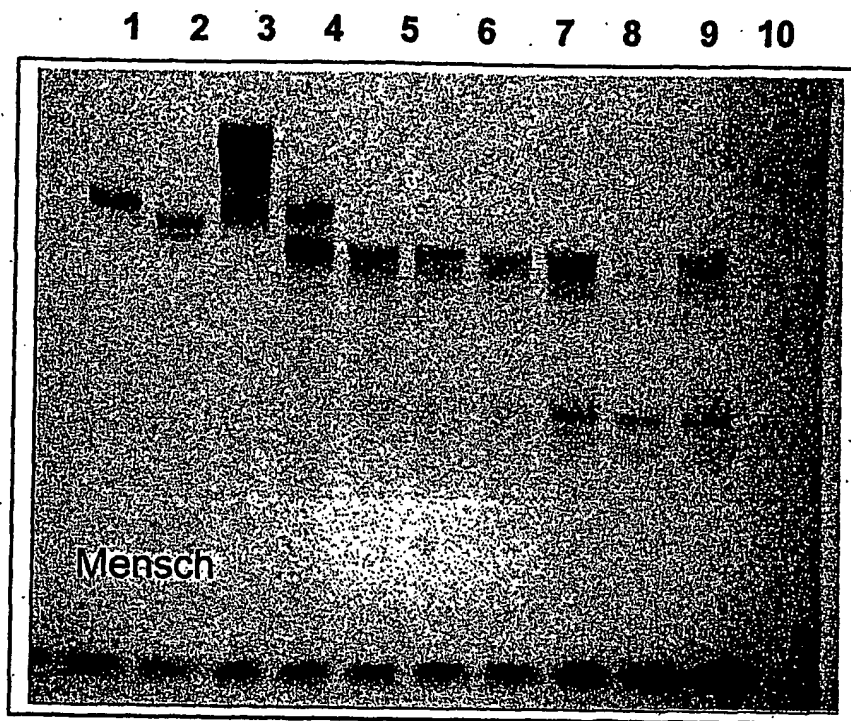


Fig. 17

11/20

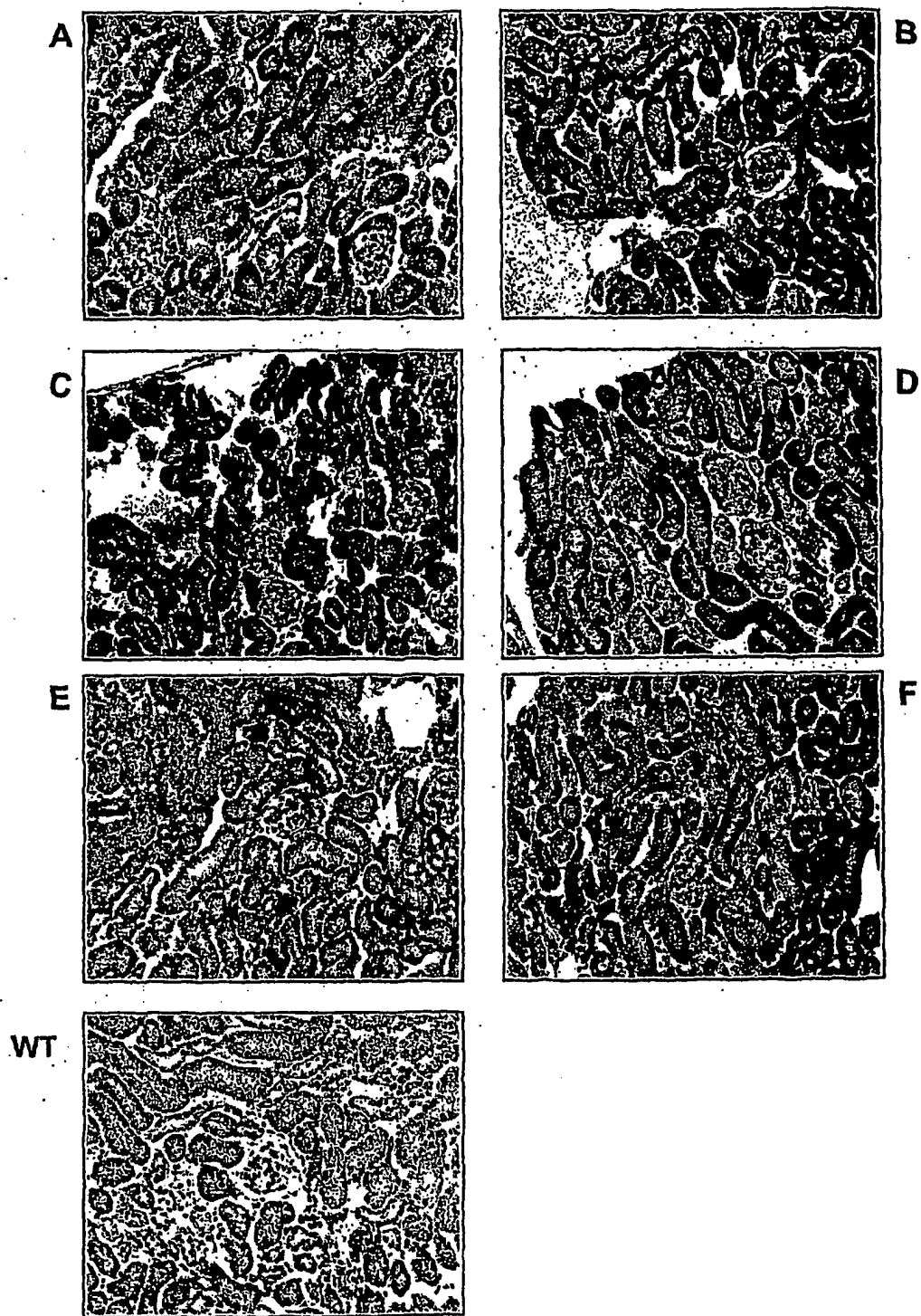


Fig. 18

12/20

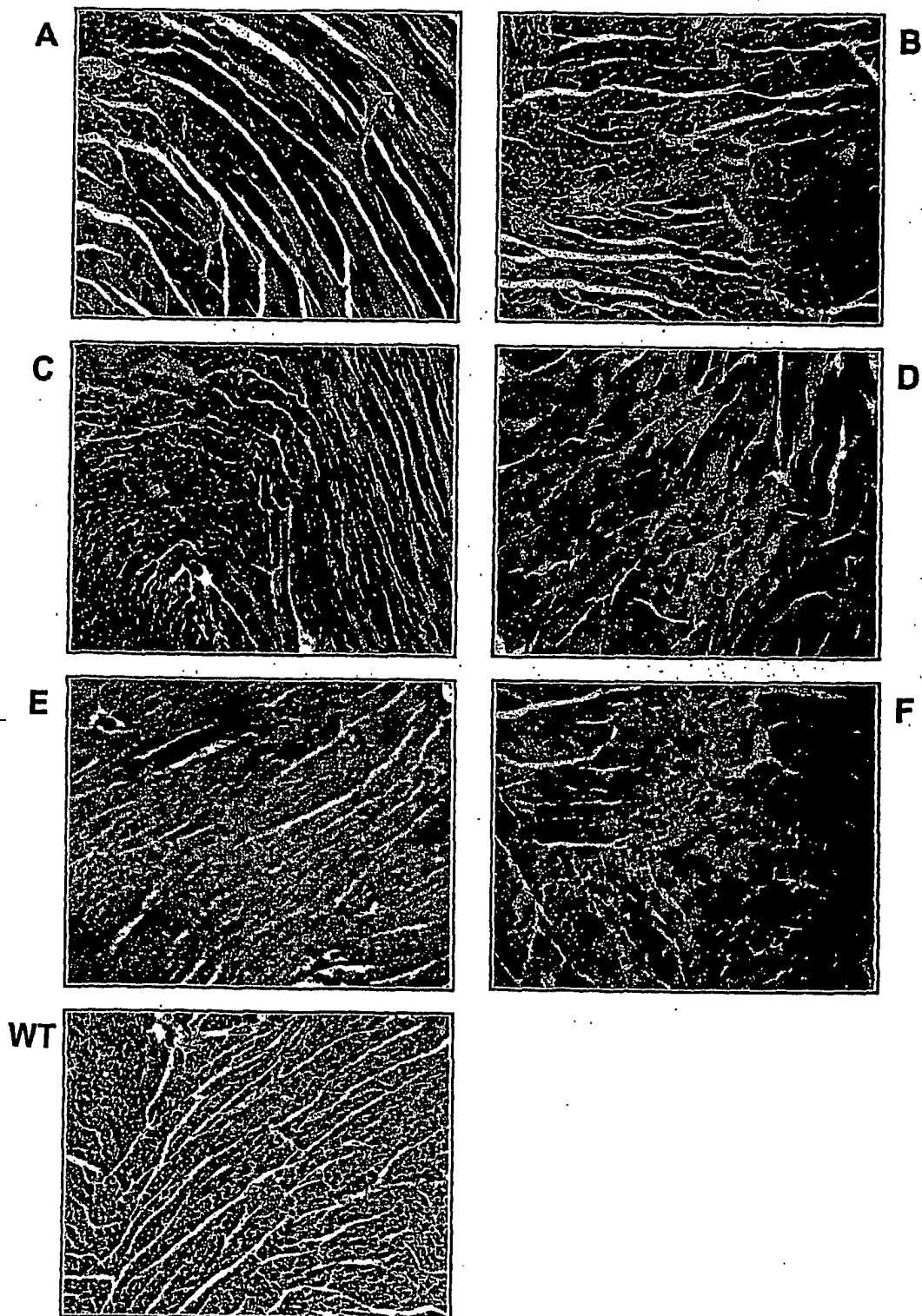


Fig. 19

13/20

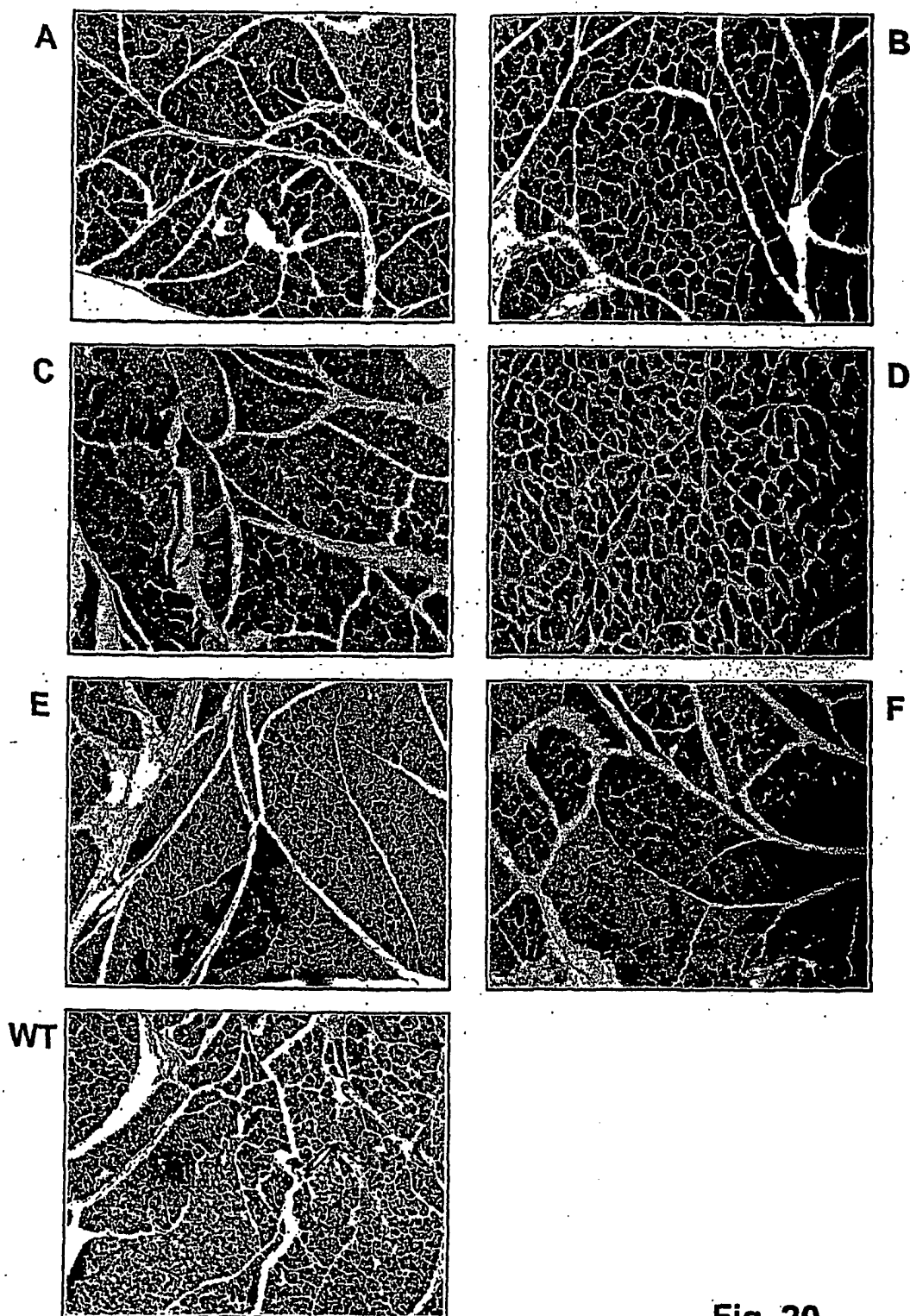


Fig. 20

14/20

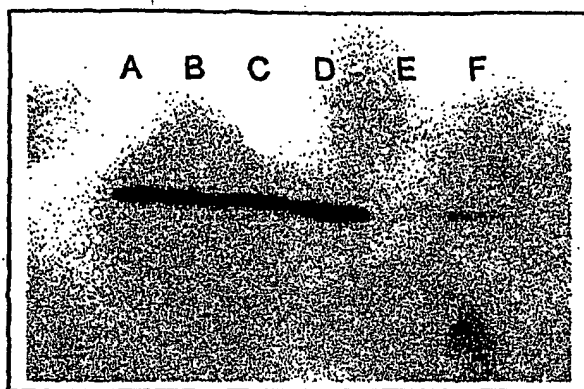


Fig. 21

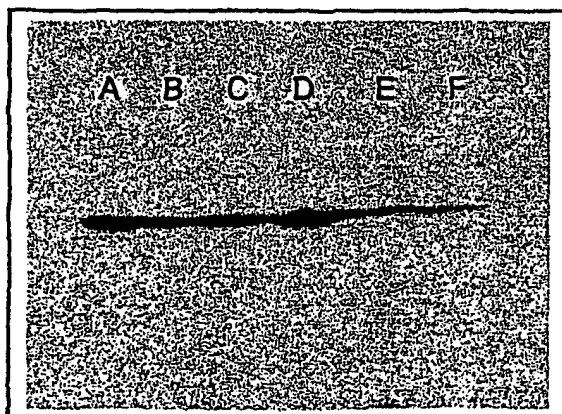
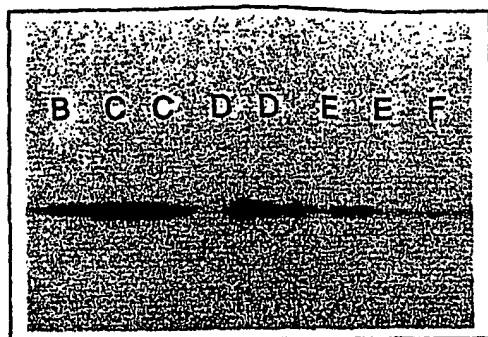
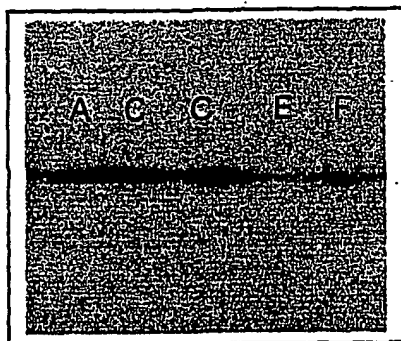


Fig. 22

15/20



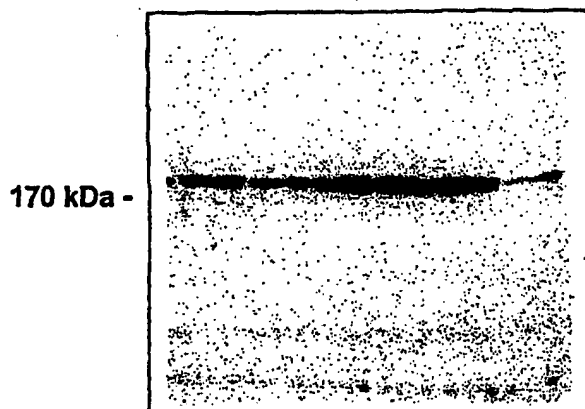
- 26 kDa



- 26 kDa

Fig. 23

K 2-22-2
EGFR 2-19-2
EGFR 2⁵-19-2⁵
K 2-22-0
Unbehandelt
EGFR 0-22-2



170 kDa -

Fig. 24

16/20

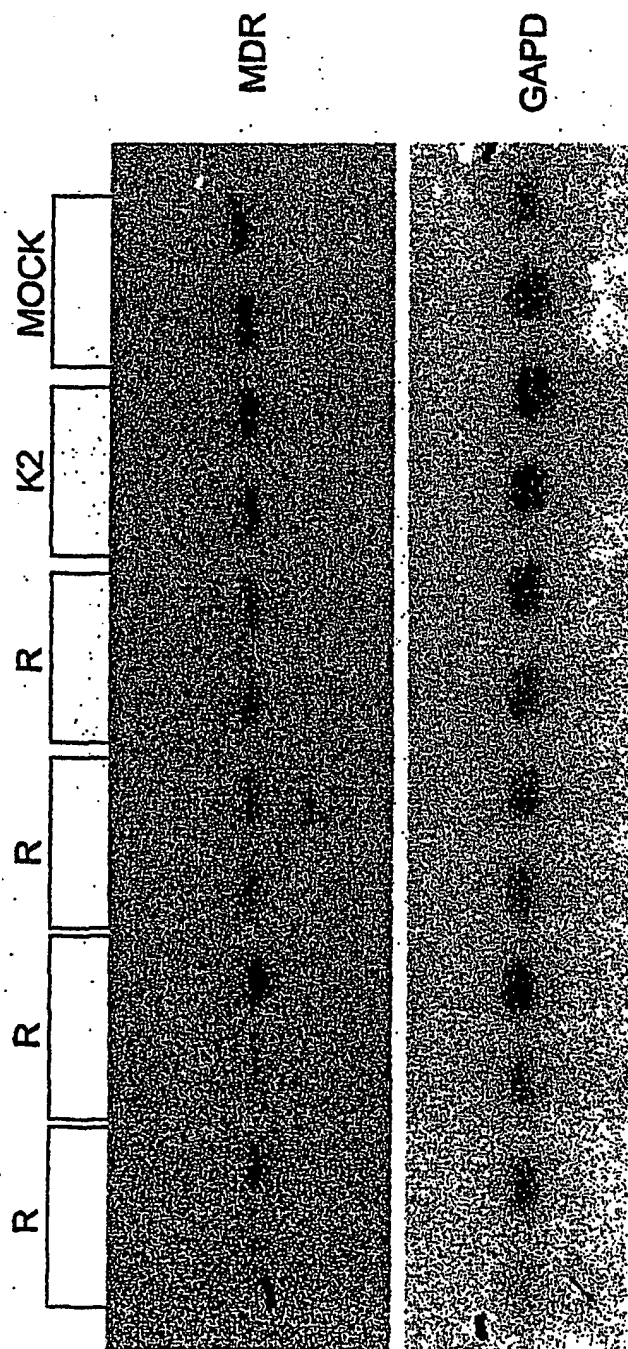


Fig. 25a

17/20

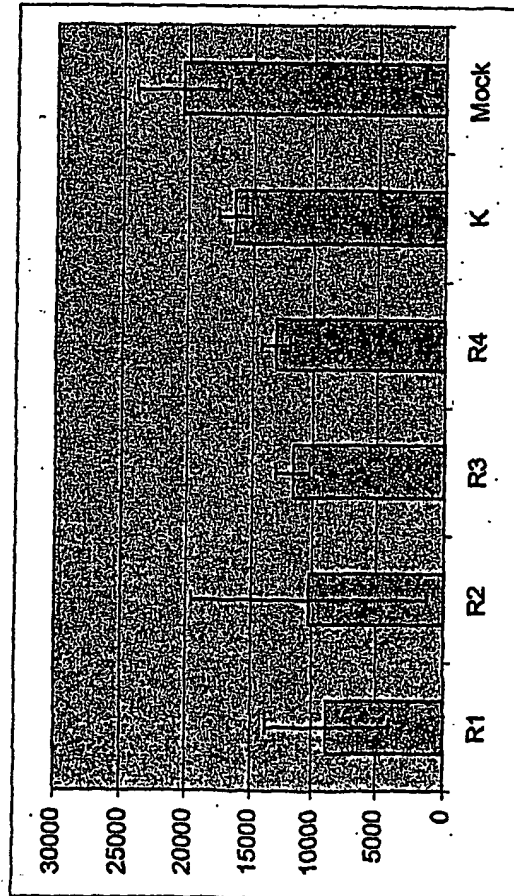


Fig. 25b

18/20

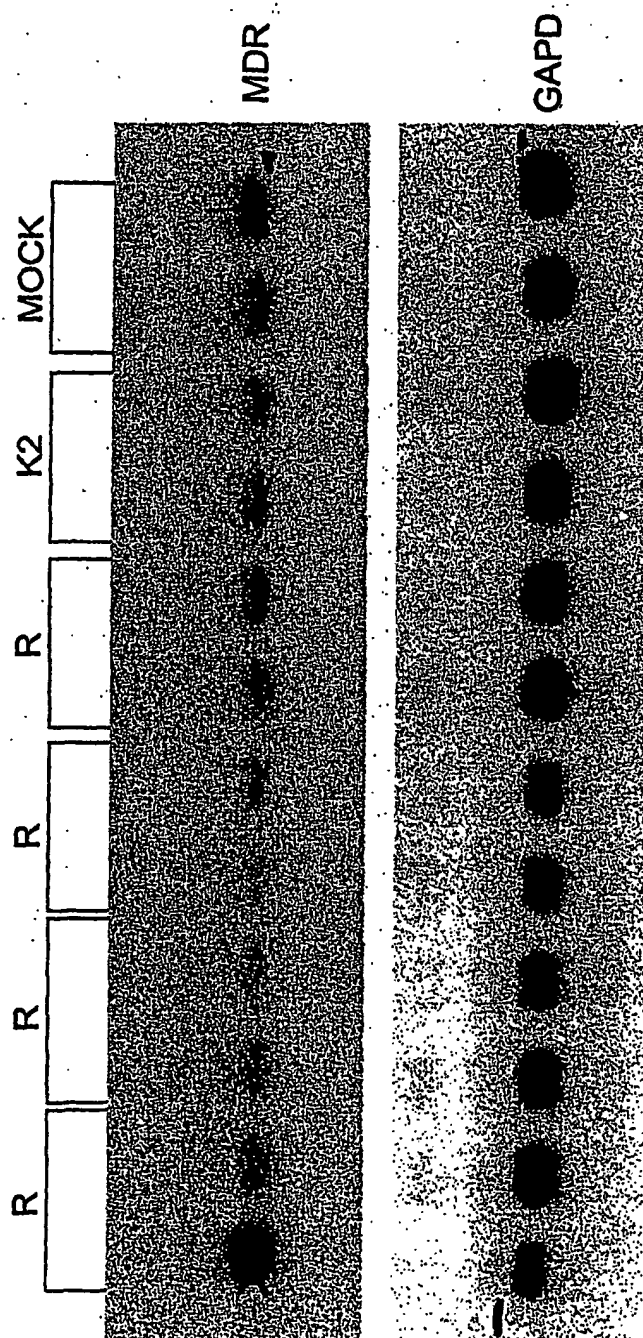


Fig. 26a

19/20

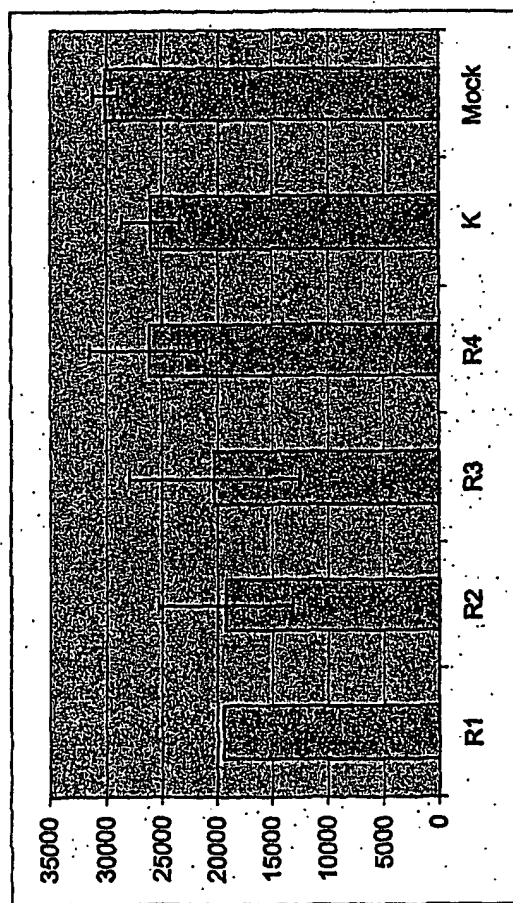


Fig. 26b

20/20

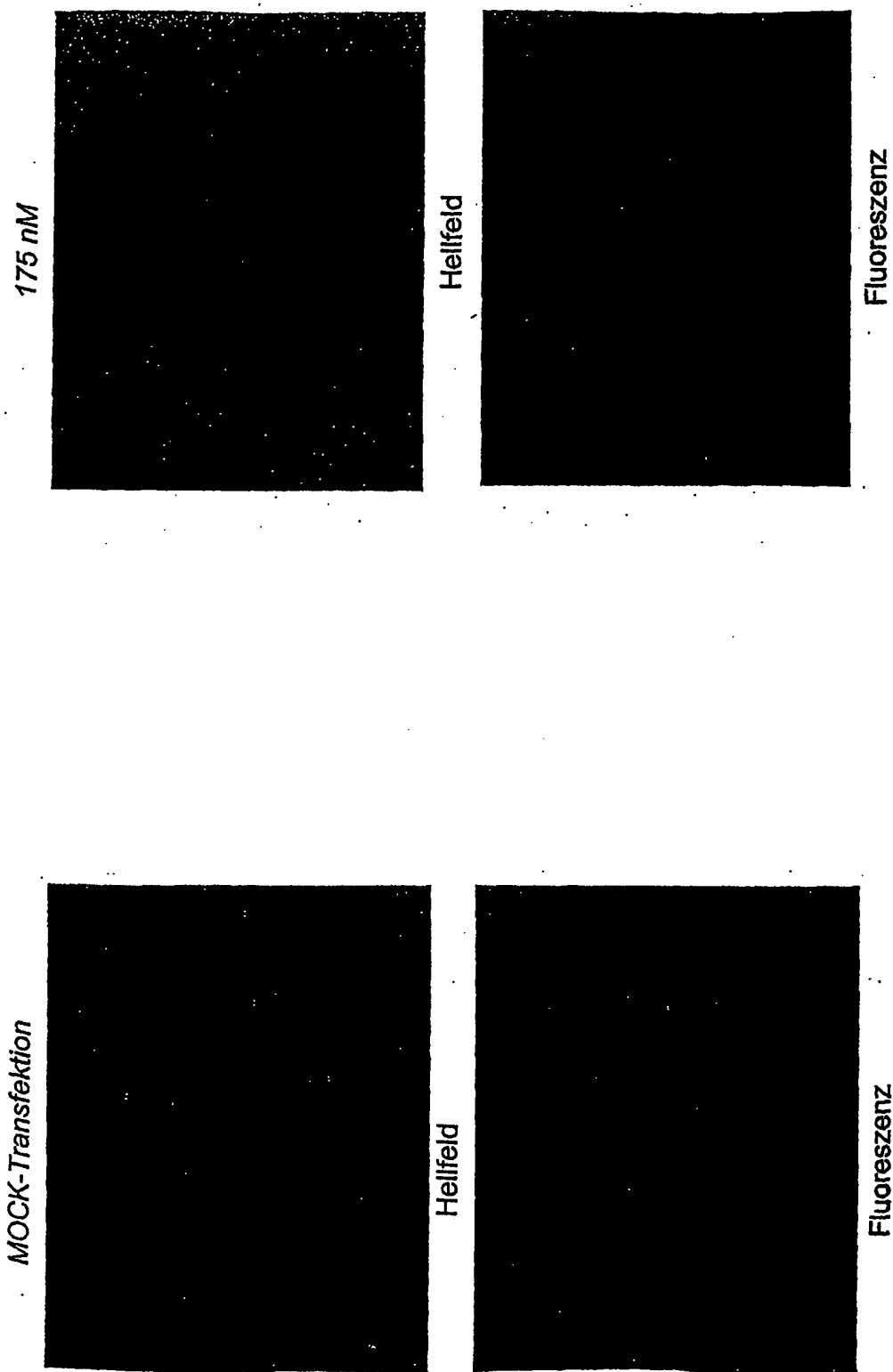


Fig. 27

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

5 <120> Verfahren zur Hemmung der Expression
eines Zielgens

<130>

10 <140>

<141>

<160> 142

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2955

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<300>

<302> Eph A1

<310> NM00532

25

<300>

<302> ephrin A1

<310> NM00532

30 <400> 1

atggagcggc	gctggcccct	ggggctaggg	ctgggtgctgc	tgctctgcgc	cccgtgccc	60
ccggggggcgc	gcgccaagga	agttactctg	atggacacaa	gcaaggcaca	gggagagctg	120
ggctggctgc	tggatcccc	aaaagatggg	tggagtgaac	agcaacagat	actgaatggg	180
acacccctct	acatgtacca	ggactgccc	atgcaaggac	gcagagacac	tgaccactgg	240
35 ctctgcctcca	attggatcta	ccgcggggag	gaggcttccc	gcgtccacgt	ggagctgcag	300
ttcacccgtgc	gggactgcaa	gagtttccct	gggggagccg	ggcctctggg	ctgcaaggag	360
accttcaacc	ttctgtacat	ggagagtgc	caggatgtgg	gcattcagct	ccgacggccc	420
ttgttccaga	aggtaaccac	ggtggctgca	gaccagagct	tcaccattcg	agaccttgcg	480
tctggctccg	tgaagctgaa	tgtggagcgc	tgctctctgg	gccgcctgac	ccgccgtggc	540
40 ctctacctcg	ctttccacaa	cccggtgcc	tgtgtggccc	tggtgtctgt	ccgggtcttc	600
taccagcgt	gtcctgagac	cctgaatggc	ttggcccatt	tcccagacac	tctgcctggc	660
ccgctgggt	tggtggaagt	ggcgggcacc	tgcttgcccc	acgcgcgggc	cagcccagg	720
ccctcagggt	caccccgcat	gcactgcagc	cctgatggcg	agtggctggg	gcctgtagga	780
cggtgcact	gtgagcctgg	ctatgaggaa	ggtggcagtg	gcgaagcatg	tggtgcctgc	840
45 cctagcggct	cctaccggat	ggacatggac	acacccatt	gtctcacgtg	ccccagcag	900
agcactgctg	agtctgaggg	ggccaccatc	tgtacctgtg	agagcggcca	ttacagagct	960
cccggggagg	gccccagggt	ggcatgcaca	ggtccccct	cggccccccg	aaacctgagc	1020
ttctctgcct	cagggactca	gctctccctg	cggtgggaac	ccccagcaga	tacgggggga	1080
gcgcaggatg	tcagatacag	tgtgaggtgt	tcccagtgtc	agggcacagc	acaggacggg	1140
50 ggccctgcc	agccctgtgg	ggtggcgctg	cacttctcgc	cggggggccc	ggcgctcacc	1200
acacctgcag	tgcattgcaa	tggccttgaa	ccttatgcc	actacacctt	taatgtggaa	1260
gccccaaatg	gagtgtcagg	gctgggcagc	tctggccatg	ccagcacctc	agtcagcatc	1320
agcatggggc	atgcagagtc	actgtcaggc	ctgtctctga	gactgggtgaa	gaaagaaccg	1380
aggcaactag	agctgacctg	ggcgggggtc	cggccccgaa	gccctggggc	gaacctgacc	1440
55 tatgagctgc	acgtgctgaa	ccaggatgaa	gaacgggtacc	agatgggttct	agaacccagg	1500
gtcttgcctga	cagagctgca	gcctgacacc	acatacatcg	tcagagtccg	aatgctgacc	1560
ccactgggtc	ctggcccttt	ctcccctgat	catgagtttc	ggaccagccc	accagtgtcc	1620
aggggcctga	ctggaggaga	gattgtagcc	gtcatctttg	ggctgctgct	tggtgcagcc	1680
ttgctgcttg	ggattctcgt	tttccgggtc	aggagagccc	agcggcagag	gcagcagagg	1740
60 cagctgaccg	cgccaccgat	gtggatcgag	aggacaagct	gtgctgaagc	cttatgtggt	1800
acctccaggc	ataccaggac	cctgcacagg	gagccttgga	ctttacccgg	aggctggtct	1860
aattttcctt	cccgggagct	tgatccagcg	tggtgatgg	tggaactgt	cataggagaa	1920

	ggagagtttg	gggaagtgt	tgcagggacc	ctcaggctcc	ccagccagga	ctgcaagact	1980
	gtggccatta	agaccttaaa	agacacatcc	ccagggtggc	agtgggtgaa	cttccttcga	2040
	gaggcaacta	tcatgggcca	gtttagccac	cgcataatc	tgcattctgga	aggcgtcgtc	2100
5	acaaagcgaa	agccgatcat	gatcatcaca	gaatttatgg	agaatgcagc	cctggatgcc	2160
	ttcctgaggg	agcgggagga	ccagctggtc	cctgggcagc	tagtggccat	gctgcagggc	2220
	atagcatctg	gcatagaacta	cctcagtaat	cacaattatg	tccaccggga	cctggctgcc	2280
	agaaacatct	tgggtgaatca	aaacctgtgc	tgcaagggtg	ctgacttttg	cctgactcgc	2340
	ctcctggatg	actttgatgg	cacatacgaa	acccaggag	gaaagatccc	tatccgttgg	2400
	acagcccctg	aagccattgc	ccatcggatc	ttcaccacag	ccagcgatgt	gtggagcttt	2460
10	gggatttgtga	tgtgggaggt	gctgagcttt	ggggacaagc	cttatgggga	gatgagcaat	2520
	caggaggtta	tgaagagcat	tgaggatggg	taccggttgc	cccctcctgt	ggactgccct	2580
	gcccctctgt	atgagctcat	gaagaactgc	tgggcatatg	accgtgccc	ccggccacac	2640
	ttccagaagc	ttcaggcaca	tctggagcaa	ctgcttgcca	acccccactc	cctgcggacc	2700
	attgccaaact	tgaccccag	ggtgactcct	cgcctgccc	gcctgagtgg	ctcagatggg	2760
15	atcccgtatc	gaaccgtctc	tgagtggctc	gagtcacatc	gcataaaacg	ctacatcctg	2820
	cacttccact	cggtctgggt	ggacaccatg	gagtgtgtgc	tggagctgac	cgtgaggac	2880
	ctgacgcaga	tgggaatcac	actgcccggg	caccagaagc	gcattctttg	cagtattcag	2940
	ggattcaagg	actga					2955
20	<210> 2						
	<211> 3042						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
25	<300>						
	<302> ephrin A2						
	<310> XM002088						
30	<400> 2						
	gaagtgcgc	gcaggccggc	gggcccggagc	ggacaccgag	gccggcgtgc	aggcgtgcgg	60
	gtgtgcggga	gccgggctcg	gggggatcgg	accgagagcg	agaagcgcgg	catggagctc	120
	caggcagccc	gcgcctgctt	cgccctgctg	tggggctgtg	cgctggccgc	ggccgcggcg	180
35	gcgcagggca	aggaagtgg	actgctggac	tttgctgcag	ctggagggga	gctcggctgg	240
	ctcacacacc	cgtatggcaa	aggggtgggac	ctgatgcaga	acatcatgaa	tgacatgccg	300
	atctacatgt	actccgtgtg	caacgtgatg	tctggcgacc	aggacaactg	gctccgcacc	360
	aactgggtgt	accgaggaga	ggctgagcgt	atcttcattg	agctcaagtt	tactgtacgt	420
	gactgcaaca	gcttccttgg	tggcgccagc	tccctgcaag	agactttcaa	cctctactat	480
40	gccgagtcgg	acctggacta	cgccaccaac	ttccagaagc	gcctgttcac	caagattgac	540
	accattgcgc	ccgatgagat	caccgtcagc	agcgacttcg	aggcacgcca	cgtgaagctg	600
	aacgtggagg	agcgtcccg	ggggccgctc	accgcgaaag	gcttctacct	ggccttccag	660
	gatatcgggtg	cctgtgtggc	gctgctctcc	gtccgtgtct	actacaagaa	gtgccccgag	720
	ctgctgcagg	gcctggccca	cttccttgag	accatcgccg	gctctgatgc	accttccctg	780
	gccactgtgg	ccggcacctg	tgtggaccat	gccgtgggtg	caccgggggg	tgaagagccc	840
45	cgtatgcact	gtgcagtgg	tggcgagtgg	ctgggtgccc	ttgggcagtg	cctgtgccag	900
	gcaggctacg	agaaggtgga	ggatgcctgc	caggcctgct	cgcttgatt	ttttaagttt	960
	gaggcatctg	agagcccctg	cttggagtgc	cctgagcaca	cgctgccatc	ccctgagggt	1020
	gccacctcct	gcgagtgtga	ggaaggcttc	ttccgggcac	ctcaggaccc	agcgtcgatg	1080
	ccttgccacac	gacccccctc	cgccccacac	tacctcacag	ccgtgggcat	gggtgccaag	1140
50	gtggagctgc	gctggacgcc	ccctcaggac	agcgggggccc	gcgaggacat	tgtctacagc	1200
	gtcacctgcg	aacagtgtcg	gcccaggtct	ggggaatgcg	ggccgtgtga	ggccagtgtg	1260
	cgctactcgg	agcctcctca	cggactgacc	cgcaccagtg	tgacagttag	cgacctggag	1320
	ccccacatga	actacacctt	caccgtggag	gcccgcgaatg	gcgtctcagg	cctggtaacc	1380
	agccgcagct	tcggtactgc	cagtaaccaga	atcacccaga	cagagccccc	caaggtagag	1440
55	ctggagggcc	gcagcaccac	ctcgcttagc	gtctcctgga	gcatccccc	gccgcagcag	1500
	agccgagtgt	ggaagtacga	ggtcacttac	cgcaagaagg	gagactccaa	cagctacaat	1560
	gtgcgcccga	ccgaggggtt	ctccgtgacc	ctggacgacc	tggccccaga	caccacctac	1620
	ctgggtccagg	tgcaggcact	gacgcaggag	ggccaggggg	ccggcagcaa	ggtgcacgaa	1680
	ttccagacgc	tgtccccgga	gggatctggc	aacttggcgg	tgattggcgg	cgtggctgtc	1740
60	ggtgtgggtc	tgtctctggg	gctggcagga	gttggcttct	ttatccaccg	caggaggaag	1800
	aaccagcgtg	cccgcacgtc	cccgaggagc	gtttacttct	ccaagtcaga	acaactgaag	1860
	cccctgaaga	catacgtgga	ccccacaca	tatgaggacc	ccaaccaggc	tgtgttgaag	1920

5 ttcactaccg agatccatcc atcctgtgtc actcggcaga aggtgatcgg agcaggagag 1980
 tttggggagg tgtacaaggg catgctgaag acatcctcgg ggaagaagga ggtgccggtg 2040
 gccatcaaga cgctgaaagc cggctacaca gagaagcagc gagtggactt cctcggcgag 2100
 gccggcatca tgggccagtt cagccaccac aacatcatcc gcctagaggg cgtcatctcc 2160
 aaatacaagc ccatgatgat catcactgag tacatggaga atggggccct ggacaagttc 2220
 cttcgggaga aggatggcga gttcagcgtg ctgcagctgg tgggcatgct gcggggcatc 2280
 gcagctggca tgaagtacct ggccaacatg aactatgtgc accgtgacct ggctgcccgc 2340
 aacatcctcg tcaacagcaa cctggtctgc aaggtgtctg actttggcct gtcccgctg 2400
 ctggaggacg accccgaggg cactacacc accagtggcg gcaagatccc catccgctgg 2460
 10 accgcccccg aggccatttc ctaccggaag ttcacctctg ccagcgacgt gtggagcttt 2520
 ggcattgtca tgtgggaggt gatgacctat ggcgagcggc cctactggga gttgtccaac 2580
 cagcaggtga tgaagccat caatgatggc ttccggctcc ccacaccat ggactgcccc 2640
 tccgccatct accagctcat gatgcagtgc tggcagcagg agcgtgcccc cgccccaaag 2700
 ttcgctgaca tcgtcagcat cctggacaag ctcatctctg cccctgactc cctcaagacc 2760
 15 ctggctgact ttgacccccg cgtgtctatc cggtcctcca gcacgagcgg ctccggagggg 2820
 gtgcccttcc gcacgggtgc cgagtggctg gagtccatca agatgcagca gtatacggag 2880
 cacttcatgg cggccggcta cactgccatc gagaaggtgg tgcagatgac caacgacgac 2940
 atcaagagga ttggggtgcg gctgcccggc caccagaagc gcatcgcccta cagcctgctg 3000
 20 ggactcaagg accaggtgaa cactgtgggg atccccatct ga 3042

<210> 3

<211> 2953

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<300>

<302> ephrin A3

<310> NM005233

30

<400> 3

atggattgtc agctctccat cctcctcctt ctcagctgct ctgttctcga cagcttcggg 60
 gaactgattc cgcagccttc caatgaagtc aatctactgg attcaaaaac aattcaaggg 120
 35 gagtggggtt ggatctctta tccatcacat ggggtgggaag agatcagtgg tgtggatgaa 180
 cattacacac ccatcaggac ttaccaggtg tgcaatgtca tggaccacag tcaaaaacaat 240
 tggctgagaa caaactgggt ccccgaggaac tcagctcaga agattttatgt ggagctcaag 300
 ttactcttac gagactgcaa tagcattcca ttggttttag gaacttgcaa ggagacattc 360
 aacctgtact acatggagtc tgatgatgat catgggggtga aatttcgaga gcatcagttt 420
 acaaaagattg acaccattgc agctgatgaa agtttcactc aaatggatct tggggaccgt 480
 40 attctgaagc tcaacactga gattagagaa gtaggctctg tcaacaagaa gggattttat 540
 ttggcatttc aagatgttgg tgcttgtgtt gccttggtgt ctgtgagagt atacttcaaa 600
 aagtgtccat ttacagtga gaatctggct atgtttccag acacggtacc catggactcc 660
 cagtccctgg tggagggttag agggctctgt gtcaacaatt ctaaggaggga agatcctcca 720
 aggatgtact gcagtacaga aggcgaatgg cttgtaccca ttggcaagtg ttcctgcaat 780
 45 gctgggtatg aagaaaagagg ttttatgtgc caagcttgc gaccaggttt ctacaaggca 840
 ttggatggta atatgaagtg tgctaagtgc ccgctcaca gttctactca ggaagatggg 900
 tcaatgaact gcaggtgtga gaataattac ttccgggcag acaaagaccc tccatccatg 960
 gcttgtagccc gacctccatc ttcaccaaga aatgttatct ctaatatataa cgagacctca 1020
 gtatccttgg actggagttg gcccctggac acaggaggcc ggaaagatgt taccttcaac 1080
 50 atcatatgta aaaaatgtgg gtggaatata aaacagtgtg agccatgcag cccaaatgtc 1140
 cgcttcctcc ctgcagattt tggactcacc aacaccacgg tgacagtgc agacctctg 1200
 gcacatacta actacacctt tgagattgat gccgttaatg ggggtgtcaga gctgagctcc 1260
 ccaccaagac agtttgcgtc ggtcagcatc acaactaatc aggtgtctcc atcacctgtc 1320
 ctgacgatta agaaagatcg gacctccaga aatagcatct ctttgcctg gcaagaacct 1380
 55 gaacatccta atgggatcat attggactac gaggtcaaat actatgaaaa gcaggaacaa 1440
 gaaacaagtt ataccattct gagggcaaga ggcacaaatg ttaccatcag tagcctcaag 1500
 cctgacacta tatacgtatt ccaaatecga gcccgaaacag ccgctggata tgggacgaac 1560
 agccgcaagt ttgagtttga aactagtcca gactctttct ccatctctgg tgaaagtagc 1620
 caagtgggtca tgatcgccat ttcagcggca gtagcaatta ttctcctcac tgtgtctatc 1680
 60 tatgttttga ttgggaggtt ctgtggctat aagtcaaaaac atggggcaga tgaaaaaaga 1740
 cttcatTTTTT gcaatgggca tttaaaactt ccaggtctca ggacttatgt tgaccacat 1800
 acatatgaag accctaccca agctgttcat gagtttgcca aggaattgga tgccaccaac 1860

5 atattccattg ataaagtgtg tggagcaggt gaatttggag aggtgtgcag tggctcgctta 1920
 aaacttcctt caaaaaaaga gatttcagtg gccattaaaa ccctgaaagt tggctacaca 1980
 gaaaagcaga ggagagactt cctgggagaa gcaagcatta tgggacagtt tgaccacccc 2040
 aatatcattc gactggaagg agttgttacc aaaagtaagc cagttatgat tgtcacagaa 2100
 10 tacatggaga atggttcctt ggatagtttc ctacgtaaac acgatgcccc gtttactgtc 2160
 attcagctag tggggatgct tcgagggata gcactctggca tgaagtacct gtcagacatg 2220
 ggctatgttc accgagacct cgctgctcgg aacatcttga tcaacagtaa cttgggtgtg 2280
 aaggtttctg atttcggact ttcgcgtgtc ctggaggatg acccagaagc tgcttataca 2340
 acaagaggag ggaagatccc aatcagggtg acatcaccag aagctatagc ctaccgcaag 2400
 15 ttcacgtcag ccagcgatgt atggagttat gggattgttc tctgggaggt gatgtcttat 2460
 ggagagagac catactggga gatgtccaat caggatgtaa ttaaagctgt agatgagggc 2520
 tatcgactgc cacccccac ggactgcccc gctgccttgt atcagctgat gctggactgc 2580
 tggcagaaag acaggaacaa cagacccaag tttgagcaga ttgttagtat tctggacaag 2640
 cttatccgga atcccggcag cctgaagatc atcaccagtg cagccgcaag gccatcaaac 2700
 20 cttcttcttg accaaagcaa tgtggatata tctaccttcc gcacaacagg tgactggctt 2760
 aatgggtgtcc ggacagcaca ctgcaaggaa atcttcacgg gcgtggagta cagttcttgt 2820
 gacacaatag ccaagatttc cacagatgac atgaaaaagg ttggtgtcac cgtgggtggg 2880
 ccacagaaga agatcatcag tagcattaaa gctctagaaa cgcaatcaaa gaatggcccc 2940
 gttcccgtgt aaa 2953

 <210> 4
 <211> 2784
 <212> DNA
 25 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> ephrin A4
 <310> XM002578
 30
 <400> 4
 atggatgaaa aaaatacacc aatccgaacc taccaagtgt gcaatgtgat ggaacccagc 60
 cagaataaact ggctacgaac tgattggatc acccgagaag gggctcagag ggtgtatatt 120
 35 gagattaaat tcaccttgag ggactgcaat agtcttcagg gcgtcatggg gacttgcaag 180
 gagacgttta acctgtacta ctatgaatca gacaacgaca aagagcgttt catcagagag 240
 aaccagtttg tcaaaattga caccattgct gctgatgaga gcttcaccca agtggacatt 300
 ggtgacagaa tcatgaagct gaacaccgag atccgggatg tagggccatt aagcaaaaag 360
 ggggttttacc tggccttttca ggatgtgggg gcctgcacatg ccctggtatc agtccgtgtg 420
 40 ttctataaaa agtgtccact cacagtccgc aatctggccc agtttcctga caccatcaca 480
 ggggctgata cgtcttcctt cgtggaagtt cgaggctcct gtgtcaacaa ctcagaagag 540
 aaagatgtgc caaaaatgta ctgtggggca gatggtgaat ggctggtacc cattggcaac 600
 tgcttatgca acgctgggca tgaggagcgg agcggagaat gccaaagctt caaaatttga 660
 tattacaagg ctctctccac ggatgccacc tgtgccaaag gccaccccca cagctactct 720
 gtctgggaag gagccacctc gtgcacctgt gaccgaggct ttttcagagc tgacaacgat 780
 45 gctgcctcta tgcctgcac ccgtccacca tctgtccccc tgaacttgat ttcaaattgc 840
 aacgagacat ctgtgaactt ggaatggagt agccctcaga atacagggtg ccgccaggac 900
 atttcctata atgtggtatg caagaaatgt ggagctggtg accccagcaa gtgccgaccc 960
 tgtggaagtg ggttccacta caccacacag cagaatggct tgaagaccac caaagtctcc 1020
 atcactgacc tcctagctca taccaattac accttgaaa tctgggctgt gaattggagt 1080
 50 tccaaatata accctaaccc agaccaatca gtttctgtca ctgtgaccac caaccaagca 1140
 gcaccatcat ccattgcttt ggtccaggct aaagaagtca caagatacag tgtggcactg 1200
 gcttggcttg aaccagatcg gcccaattgg gtaattcctg aatatgaagt caagtattat 1260
 gagaaggatc agaatgagcg aagctatcgt atagtccgga cagctgccag gaacacagat 1320
 atcaaaggcc tgaacctct cacttcctat gttttccacg tgcgagccag gacagcagct 1380
 55 ggctatggag acttcagtga gcccttggag gttacaacca acacagtgcc ttcccggatc 1440
 attggagatg gggctacact cactgtctct ctggtctctg tctcgggcag tgtggtgtgt 1500
 gtggtaattc tcatgacgc ttttgtcatc agccggagac ggaagtaata cagtaaagcc 1560
 aaacaagaag cggatgaaga gaaacatttg aatcaagggt taagaacata tgtggacccc 1620
 60 tttacgtacg aagatcccaa ccaagcagtg cgagagtttg ccaagaaat tgacgcaccc 1680
 tgcattaaga ttgaaaaagt tataggagtt ggtgaatttg gtgaggtatg cagtgggctg 1740
 ctcaaagtgc ctggcaagag agagatctgt gtggctatca agactctgaa agctggttat 1800
 acagacaaac agaggagaga cttcctgagt gaggccagca tcatgggaca gtttgacctat 1860

	ccgaacatca	ttcacttggga	aggcgtgggtc	actaaatgta	aaccagtaat	gatcataaca	1920
	gagtacatgg	agaatggctc	cttggatgca	ttcctcagga	aaaatgatgg	cagattttaca	1980
	gtcatttcagc	tggtgggcat	gcttcgtggc	attgggtctg	ggatgaagta	tttatctgat	2040
5	atgagctatg	tgcatcgtga	tctggccgca	cggaaacatcc	tggtgaacag	caacttggtc	2100
	tgcaaaagtgt	ctgatttttgg	catgtcccga	gtgcttgagg	atgatccgga	agcagcttac	2160
	accaccaggg	gtggcaagat	tcctatccgg	tggaactgcg	cagaagcaat	tgccatatcgt	2220
	aaattcacat	cagcaagtga	tgtatggagc	tatggaatcg	ttatgtggga	agtgatgtcg	2280
	tacggggaga	ggccctattg	ggatatgtcc	aatcaagatg	tgattaaagc	cattgaggaa	2340
10	ggctatcggg	tacccctctc	aatggactgc	cccattgctg	tccaccagct	gatgctagac	2400
	tgctggcaga	aggagaggag	cgacaggcct	aaatttgggc	agattgtcaa	catgttggac	2460
	aaactcatcc	gcaaccccaa	cagcttgaag	aggacaggga	cggagagctc	cagacctaac	2520
	actgccttgt	tggtatcca	ctccctgaa	ttctctgctg	tggtatcagt	gggcgattgg	2580
	ctccaggcca	ttaaaatgga	ccggtataag	gataaactca	cagctgctgg	ttataccaca	2640
15	ctagaggctg	tggtgcacgt	gaaccaggag	gacctggcaa	gaattggtat	cacagccatc	2700
	acgcaccaga	ataagatttt	gagcagtgtc	caggcaatgc	gaacccaaat	gcagcagatg	2760
	cacggcagaa	tggttcccgt	ctga				2784
	<210>	5					
20	<211>	2997					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
25	<302>	ephrin A7					
	<310>	XM004485					
	<400>	5					
30	atgggtttttc	aaactcggta	cccttcattg	attatttttat	gctacatctg	gctgctccgc	60
	tttgacacaca	caggggaggg	gcaggctgag	aagggaagta	tactgctgga	ttctaaagca	120
	caacaaacag	agttggagtg	gatttcctct	ccaccaaatg	gggtgggaaga	aattagtggt	180
	ttggatgaga	actatacccc	gatacgaaca	taccagggtg	gccaaagcat	ggagcccaac	240
	caaaacaact	ggctcgggac	taactggatt	tccaaaggca	atgcacaaag	gattttttgta	300
35	gaattgaaat	tcaccctgag	ggattgtaac	agtcttcctg	gagtactggg	aacttgcaag	360
	gaaacattta	atttgtaact	ttatgaaaca	gactatgaca	ctggcaggaa	tataagagaa	420
	aacctctatg	taaaaataga	caccattgct	gcagatgaaa	gttttaccca	aggtgacctt	480
	ggtgaaagaa	agatgaagct	taacactgag	gtgagagaga	ttggaccttt	gtccaaaaag	540
	ggattctatc	ttgcctttca	ggatgtaggg	gcttgcatag	ctttgggtttc	tgtcaaagtg	600
40	tactacaaga	agtgctggtc	cattattgag	aacttagcta	tccttccaga	tacagtga	660
	ggttcagaat	tttctctttt	agtcgaggtt	cgagggacat	gtgtcagcag	tgagagggaa	720
	gaagcggaaa	acgccccag	gatgcactgc	agtcgagaag	gagaatgggt	agtgccatt	780
	ggaaaatgta	tctgcaaagc	aggctaccag	caaaaaggag	acacttggtg	accctgtggc	840
	cgtgggttct	acaagtcttc	ctctcaagat	cttcagtgtc	ctcgttgtcc	aactcacagt	900
	ttttctgata	aagaaggctc	ctccagatgt	gaatgtgaag	atgggtatta	cagggctcca	960
45	tctgacccac	catacgttgc	atgcacaagg	cctccatctg	caccacagaa	cctcatttttc	1020
	aacatcaacc	aaaccacagt	aagtttgga	tggaagtctc	ctgcagacaa	tgggggaaga	1080
	aacgatgtga	cctacagaat	attgtgtaag	cggtgcagtt	gggagcaggg	cgaatgtgtt	1140
	ccctgtggga	gtaacattgg	atacatgccc	cagcagactg	gattagagga	taactatgtc	1200
	actgtcatgg	acctgctagc	ccacgcta	tatacttttg	aagttgaagc	tgtaaatgga	1260
50	gtttctgact	taagccgac	ccagaggctc	tttgctgctg	tcagtatcac	cactgggtcaa	1320
	gcagctccct	cgcaagtgg	tggaagtaatg	aaggagagag	tactgcagcg	gagtgtcgag	1380
	ctttcctggc	aggaaccaga	gcacccaat	ggagtcatca	cagaatatga	aatcaagtat	1440
	tacgagaaa	atcaaaggga	acggacctac	tcaacagtaa	aaaccaagtc	tacttcagcc	1500
	tccattaata	atctgaaacc	aggaacagtg	tatgttttcc	agattcgggc	ttttactgct	1560
55	gctgggttatg	gaaattacag	tcccagactt	gatgttgcta	cactagagga	agctacaggt	1620
	aaaatgtttg	aagctacagc	tgtctccagt	gaacagaatc	ctgttattat	cattgtctgtg	1680
	gttgctgtag	ctgggaccat	catttttggtg	ttcatgggtc	ttggcttcat	cattggggaga	1740
	aggcactgtg	gttatagcaa	agctgaccaa	gaaggcgatg	aagagcttta	ctttcatttt	1800
	aaatttccag	gcacccaaa	ctacattgac	cctgaaacct	atgaggaccc	aaatagagct	1860
60	gtccatcaat	tcgccaagga	gctagatgcc	tcctgtatta	aaattgagcg	tgtgattggt	1920
	gcaggagaa	tcggtgaagt	ctgcagtggc	cgtttgaaac	ttccaggga	aagagatgtt	1980
	gcagtagcca	taaaaaccct	gaaagtgggt	tacacagaaa	aacaaaggag	agactttttg	2040

	tgtgaagcaa	gcacatgagg	gcagtttgac	cacccaaatg	ttgtccattt	ggaaggggtt	2100
	gttacaagag	ggaaaccagt	catgatagta	atagagttca	tggaaaatgg	agccctagat	2160
	gcattttctca	ggaaacatga	tgggcaattt	acagtcattc	agttagtagg	aatgctgaga	2220
5	ggaattgctg	ctggaatgag	atatttggct	gatatgggat	atgttcacag	ggaccttgca	2280
	gctcgcaata	ttcttgtcaa	cagcaatctc	gtttgtaaag	tgtcagattt	tggcctgtcc	2340
	cgagttatag	aggatgatcc	agaagctgtc	tatacaacta	ctggtggaaa	aattccagta	2400
	aggtggacag	caccggaagc	catccagtac	cggaaattca	catcagccag	tgatgtatgg	2460
	agctatggaa	tagtcatgtg	ggaagttatg	tcttatggag	aaagacctta	ttgggacatg	2520
10	tcaaatacaag	atgtttataaa	agcaatagaa	gaaggttatc	gtttaccagc	acccatggac	2580
	tgcccgactg	gccttcacca	gctaattgtg	gattgttggc	aaaaggagcg	tgctgaaagg	2640
	ccaaaatttg	aacagatagt	tggaattcta	gacaaaatga	ttcgaaaccc	aaatagtctg	2700
	aaaactcccc	tgggaacttg	tagtaggcca	ataagccctc	ttctggatca	aaacactcct	2760
	gatttcacta	ccttttgttc	agttggagaa	tggtctacaag	ctattaagat	ggaaagatat	2820
	aaagataaatt	tcacggcagc	tggtctacaat	tcccttgaat	cagtagccag	gatgactatt	2880
15	gaggtatgtga	tgagtttagg	gatcacactg	gttggtcatc	aaaagaaaat	catgagcagc	2940
	attcagacta	tgagagcaca	aatgctacat	ttacatggaa	ctggcattca	agtgtga	2997
	<210> 6						
20	<211> 3217						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
25	<302> ephrin A8						
	<310> XM001921						
	<400> 6						
30	ncbsncvwr	mdnctdrtn	nmstrectrst	tanmymmsar	chbmdrtnc	tdstrectr	60
	mstmmtanmy	rmtsndhstr	ycbardasna	stagnbankg	rahcsmdatv	washtmantt	120
	hdbbrandnkb	arggnbankh	msanshahar	tntanmycsm	bmnrarnvnd	tnhmsansha	180
	hamrnaaccs	snmvrsmnga	tggccccgc	ccggggccgc	ctgccccctg	cgctctgggt	240
	cgctcacggcc	gcggcgccgc	cgccacactg	cggtgcccgc	gcgcgcggcg	aagtgaattt	300
35	gctggacacg	tcgaccatcc	acggggactg	gggctggctc	acgtatccgg	ctcatgggtg	360
	ggactccatc	aacgaggtgg	acgagtcctt	ccagcccac	cacacgtacc	aggtttgcaa	420
	cgctcatgagc	cccaaccaga	acaactggct	gcgcacgagc	tgggtcccc	gagacggcgc	480
	ccggcgcgctc	tatgctgaga	tcaagtttac	cctgcgcgac	tgcaacagca	tgccctgggt	540
	gctgggacacc	tgcaaggaga	ccttcaacct	ctactacctg	gagtcggacc	gcgacctggg	600
	ggccagcaca	caagaaagcc	agttcctcaa	aatcgacacc	attgcgcccg	acgagagctt	660
40	cacaggtgcc	gaccttggtg	tgccgctgtc	caagctcaac	acggaggtgc	gcagtgtggg	720
	tccccctcagc	aagcgccgct	tctacctggc	cttccaggac	ataggtgcct	gcctggccat	780
	cctctctctc	cgcatctact	ataagaagtg	ccctgccatg	gtgcgcaatc	tggctgcctt	840
	ctcggaggca	gtgacggggg	ccgactcgct	ctcactgggt	gaggtgaggg	gccagtgcgt	900
45	gcggcactca	gaggagcggg	acacacccaa	gatgtactgc	agcgcgagg	gcgagtggct	960
	cgtgcccac	ggcaaatgcg	tgtgcagtg	cggtacagag	gagcgggggg	atgacctgtg	1020
	ggcctgtgag	ctgggcttct	acaagtcagc	ccctggggac	cagctgtgtg	cccgtgccc	1080
	tccccacagc	cactccgcag	ctccagccgc	ccaagcctgc	cactgtgacc	tcagctacta	1140
	ccgtgcagcc	ctggacccgc	cgtcctcagc	ctgcacccgg	ccaccctcgg	caccagtga	1200
50	cctgatctcc	agtgtgaatg	ggacatcag	gactctggag	tgggccccct	ccctggaccc	1260
	aggtggccgc	agtgcacatc	cctacaatgc	cggtgtccgc	cgctgcccc	gggcactgag	1320
	ccgctgcgag	gcatgtggga	gcggcaccgc	ctttgtgccc	cagcagacaa	gcctgggtga	1380
	ggccagcctg	ctggtggcca	acctgctggc	ccacatgaac	tactccttct	ggatcgaggc	1440
	cgtaaatggc	gtgtccgacc	tgagccccga	gccccgcgg	gccgtgtgtg	tcaacatcac	1500
55	cacgaaccag	gcagccccgt	cccaggtggg	ggtgatccgt	caagagcggg	gggggcagac	1560
	cagcgtctcg	ctgctgtggc	aggagccgg	gcagccgaac	ggcatcatcc	tgagatgtga	1620
	gatcaagtac	tacgagaagg	acaaggagat	gcagagctac	tccaccctca	aggccgtcac	1680
	caccagagcc	accgtctccg	gcctcaagcc	gggcacccgc	tacgtgttcc	aggtccgagc	1740
	ccgcacctca	gcagctgtg	gccgcttcag	ccaggccatg	gaggtggaga	ccgggaaacc	1800
60	ccggccccgc	tattgacacca	tgaccattgt	ctggatctgc	ctgacgctca	tcacgggcct	1860
	ggtggtgctt	ctgctcctgc	tcactctgaa	gaagaggcac	tgtggctaca	gcaaggcctt	1920
	ccaggactcg	gacgaggaga	agatgcacta	tcagaatgga	caggcacc	cactgtctct	1980
	cctgcctctg	catcaccccc	cgggaaagct	cccagagccc	cagttctatg	cggaaaccca	2040

	cacctacgag	gagccaggcc	gggcgggcgc	cagtttctact	cgggagatcg	aggcctctag	2100
	gatccacatc	gagaaaatca	tcggctctgg	agactccggg	gaagtctgct	acgggagggt	2160
	gcgggtgcca	gggcagcggg	atgtgcccgt	ggccatcaag	gccctcaaag	ccggctacac	2220
5	ggagagacag	aggcgggact	tcctgagcga	ggcgtccatc	atggggcaat	tcgaccatcc	2280
	caacatcatc	cgcctcgagg	gtgtcgtcac	ccgtggccgc	ctggcaatga	ttgtgactga	2340
	gtacatggag	aacggctctc	tggaacacct	cctgaggacc	cacgacgggc	agttcaccat	2400
	catgcagctg	gtgggcatgc	tgagaggagt	gggtgccggc	atgcgctacc	tctcagacct	2460
	gggctatgtc	caccgagacc	tgcccgcccc	caacgtcctg	gttgacagca	acctgggtctg	2520
	caaggtgtct	gacttcgggc	tctcacgggt	gctggaggac	gacccggatg	ctgcctacac	2580
10	caccacgggc	gggaagatcc	ccatccgctg	gacggcccca	gaggccatcg	ccttccgcac	2640
	cttctcctcg	gccagcgacg	tgtggagctt	cggcgtgggtc	atgtgggagg	tgctggccta	2700
	tggggagcgg	ccctactgga	acatgaccaa	ccgggatgtc	atcagctctg	tggaggaggg	2760
	gtaccgcctg	cccgaccca	tggtctgccc	ccacgccctg	caccagctca	tgctcgactg	2820
	ttggcacaag	gaccgggcgc	agcggcctcg	cttctcccag	attgtcagtg	tcctcgatgc	2880
15	gctcatccgc	agccctgaga	gtctcagggc	caccgccaca	gtcagcaggt	gcccaccccc	2940
	tgcttctgtc	cggagctgct	ttgacctcgc	agggggcagc	ggtggcgggtg	ggggcctcac	3000
	cgtgggggac	tggttggtact	ccatccgcat	gggcccgtac	cgagaccact	tcgctgcggg	3060
	cggatactcc	tctctgggca	tggtgctacg	catgaacgcc	caggacgtgc	gcgccctggg	3120
	catcaccctc	atggggcacc	agaagaagat	cctgggcagc	attcagacca	tgcgggccca	3180
20	gctgaccagc	acccaggggc	cccgcggca	cctctga			3217
	<210> 7						
	<211> 1497						
25	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<308> U83508						
30	<300>						
	<302> angiopoietin 2						
	<310> U83508						
35	<400> 7						
	atgacagttt	tcctttcctt	tgctttcctc	gctgccattc	tgactcacat	agggtgcagc	60
	aatcagcgcc	gaagtccaga	aaacagtggg	agaagatata	accggattca	acatgggcaa	120
	tgtgcctaca	ctttcattct	tccagaacac	gatggcaact	gtcgtgagag	tacgacagac	180
40	cagtacaaca	caaacgctct	gcagagagat	gctccacacg	tggaaccgga	tttctcttcc	240
	cagaaacttc	aacatctgga	acatgtgatg	gaaaattata	ctcagtggct	gcaaaaactt	300
	gagaattaca	ttgtggaaaa	catgaagtgc	gagatggccc	agatacagca	gaatgcagtt	360
	cagaaccaca	cggctaccat	gctggagata	ggaaccagcc	tcctctctca	gactgcagag	420
	cagaccagaa	agctgacaga	tggtgagacc	caggtactaa	atcaaaactt	tcgacttgag	480
	atacagctgc	tggagaattc	attatccacc	tacaagctag	agaagcaact	tcttcaacag	540
45	acaaatgaaa	tcttgaagat	ccatgaaaaa	aacagtttat	tagaacataa	aatcttagaa	600
	atggaaggaa	aacacaagga	agagttggac	accttaaagg	aagagaaaga	gaaccttcaa	660
	ggcttgggtta	ctcgtcaaac	atatataatc	caggagctgg	aaaagcaatt	aaacagagct	720
	accaccaaca	acagtgtcct	tcagaagcag	caactggagc	tgatggacac	agtcacacac	780
50	cttgtcaatc	tttgactata	agaaggtgtt	ttactaaagg	gaggaaaaag	agaggaagag	840
	aaaccattta	gagactgtgc	agatgtatat	caagctgggt	ttaataaaaag	tggaatctac	900
	actattttata	ttaataatat	gccagaaccc	aaaaagggtg	tttgcaatat	ggatgtcaat	960
	ggggggagggt	ggactgtaat	acaacatcgt	gaagatggaa	gtctagattt	ccaaaggagg	1020
	tggaagggaat	ataaaaatggg	ttttggaaat	ccctccgggt	aatattgggt	ggggaatgag	1080
	tttattttttg	ccattaccag	tcagaggcag	tacatgctaa	gaattgagtt	aatggactgg	1140
55	gaagggaacc	gagcctattc	acagtatgac	agattccaca	taggaaatga	aaagcaaaaac	1200
	tataggttgt	attttaaagg	tcacactggg	acagcaggaa	aacagagcag	cctgatctta	1260
	cacgggtgctg	atttcagcac	taaagatgct	gataatgaca	actgtatgtg	caaatgtgcc	1320
	ctcatgttaa	caggaggatg	gtggtttgat	gcttgtggcc	cctccaatct	aaatggaatg	1380
	ttctatactg	cggggacaaaa	ccatggaaaa	ctgaatggga	taaagtggca	ctacttcaaa	1440
60	gggcccagtt	actccttacg	ttccacaact	atgatgatc	gacctttaga	tttttga	1497

<210> 8
<211> 3417
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5 <300>
<310> XM001924

10 <300>
<302> Tie1

<400> 8
atggtctggc ggggtgcccc tttcttgctc cccatcctct tcttggttc tcatgtgggc 60
gcggcggtgg acctgacgct gctggccaac ctgeggctca cggacccccca gcgcttcttc 120
15 ctgacttgcg tgtctgggga ggccggggcg gggaggggct cggacgcctg gggcccgccc 180
ctgctgctgg agaaggacga ccgtatcgct cgcaccccg cggggccacc cctgcgcctg 240
gcgcgcaacg gttcgaccca gggtcacgtt cgcggcttct ccaagccctc ggacctcggtg 300
ggcgtcttct cctgcgtggg cgggtgctggg gcgcggcgca cgcgcgtcat ctacgtgcac 360
aacagccctg gagcccacct gcttccagac aagggtcacac acactgtgaa caaagggtgac 420
20 accgctgtac tttctgcacg tgtgcacaag gagaagcaga cagacgtgat ctggaagagc 480
aacggatcct acttctacac cctggactgg catgaagccc aggatgggag gttcctgctg 540
cagctcccaa atgtgcagcc accatcgagc ggcattctaca gtgccactta cctggaagcc 600
agccccctgg gcagcgccct ctttcggctc atcgtgcggg gttgtggggc tgggcgctgg 660
gggcccaggct gtaccaagga gtgcccagg tgcctacatg gaggtgtctg ccacgacct 720
25 gacggcgaaat gtgtatgccc ccctggcttc actggcacc gctgtgaaca ggcttgcaga 780
gagggccggt ttgggcagag ctgccaggag cagtgcaccg gcatatcagg ctgccggggc 840
ctcaccttct gcctcccaga cccctatggc tgctcttggt gatctggctg gagaggaagc 900
cagtgcgaag aagccttggt ccctggctat tttggggctg attgccgact ccagtggccag 960
tgtcagaatg gtggcacttg tgaccgggtc agtgggttggt tctgcccctc tgggtggcat 1020
30 ggagtgcact gtgagaagtc agaccggatc cccagatcc tcaacatggc ctccagaactg 1080
gagttcaact tagagacgat gcccgggatc aactgtgcag ctgcagggaa ccccttcccc 1140
gtgcccgggca gcataagatc acgcaagcca gacggcactg tgctcctgtc caccaaggcc 1200
attgtggagc cagagaagac cacagctgag ttcgaggtgc cccgcttggt tcttgcggac 1260
agtgggttct gggagtgcgc tgtgtccaca tctggcgccc aagacagccg gcgcttcaag 1320
35 gtcaatgtga aagtgcctcc cgtgcccctg gctgcacctc ggctcctgac caagcagagc 1380
cgccagcttg ttgtctcccc gctggtctcg ttctctgggg atggacccat ctccactgtc 1440
cgctgcact accggcccca ggacagtacc atggactggt cgaccattgt ggtggacccc 1500
agtgagaacg tgacgttaat gaacctgagg ccaaagacag gatacagtgt tctgtgtcag 1560
ctgagccggc caggggaagg aggagagggg gcctgggggg cccccaccct catgaccaca 1620
40 gactgtcctg agcctttgtt gcagccgtgg ttggagggct ggcatgtgga aggcactgac 1680
cggctgcgag tgagctgggt cttgcccttg gtgcccgggc cactgggtggg cgacggtttc 1740
ctgctgcgcc tgtgggacgg gacacggggg caggagcggc gggagaacgt ctcatcccc 1800
caggcccga ctgccctcct gacgggactc acgcctggca cccactacca gctggatgtg 1860
cagctctacc actgcaccct cctgggcccgc gctcgcacc ctgcacacgt gcttctgccc 1920
45 cccagtgggc ctccagcccc ccgacacctc cagccccagg cctctcaga ctccgagatc 1980
cagctgacat ggaagcaccg ggaggtctct cctggggcaa tatccaagta cgttgtggag 2040
gtgcaggttg ctgggggtgc aggagaccca ctgtggatag acgtggacag gcctgaggag 2100
acaagcacca tcatccgtgg cctcaacgcc agcacgcgt acctcttccg catgcccggc 2160
agcattcagg ggcctcggggc ctggagcaac acagtagaag agtccaccct gggcaacggg 2220
50 ctgaggctg agggcccagt ccaagagagc cgggcagctg aagaggccct ggatcagcag 2280
ctgatcctgg cgggtggtggg ctccgtgtct gccacctgcc tcaccatcct ggctgccctt 2340
ttaaccctgg tgtgcatccg cagaagctgc ctgcatcgga gacgcacctt cacctaccag 2400
tcaggctcgg gcgaggagac catcctgcag ttcagctcag ggaccttgac acttaccggg 2460
cggccaaaac tgcagcccga gcccctgagc taccagtgct tagagtggga ggacatcacc 2520
55 tttgaggacc tcatcgggga gggcaggtca tccgggccc atccaggtc gatcaagaag 2580
gacgggctga agatgaacgc agccatcaaa atgtgaaag agtatgcctc tgaaaatgac 2640
catcgtgact ttgcgggaga actggaagtt ctgtgcaaat tggggcatca ccccaacatc 2700
atcaacctcc tggggggcctg taagaaccga ggttacttgt atatcgctat tgaatatgcc 2760
ccctacggga acctgctaga ttttctgcgg aaaagccggg tcttagagac tgaccagct 2820
60 tttgtctgag agctctgag ccttagctcc ggcagctgct gcgtttcgcc 2880
agtgatgcgg ccaatggcat gcagtacctg agtgagaagc agttcatcca cagggaactg 2940
gctgcccggg atgtgctggg cggagagaac ctggcctcca agattgcaga cttcggcctt 3000

5 tctcggggag aggaggttta tgtgaagaag acgatggggc gtctccctgt gcgctggatg 3060
 gccattgagt ccctgaacta cagtgtctat accaccaaga gtgatgtctg gtcccttgga 3120
 gtccctcttt gggagatagt gagccttgga ggtacaccct actgtggcat gacctgtgcc 3180
 gagctctatg aaaagctgcc ccagggctac cgcattggagc agcctcgaaa ctgtgacgat 3240
 gaagtgtacg agctgatgag tcagtgtctg cgggaccgtc cctatgagcg accccccttt 3300
 gcccagattg cgctacagct aggcgcgatg ctggaagcca ggaaggccta tgtgaacatg 3360
 tcgctgtttg agaacttcac ttacgcgggc attgatgcca cagctgagga ggcctga 3417

10 <210> 9
 <211> 3375
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <300>
 <302> TEK
 <310> L06139

20 <400> 9
 atggactctt tagccagctt agttctctgt ggagtcagct tgctcctttc tggaaactgtg 60
 gaagggtgcca tggacttgat cttgatcaat tccctacctc ttgtatctga tgcctgaaaca 120
 tctctcacct gcattgcctc tgggtggcgc cccctagagc ccatcaccat aggaaggagc 180
 tttgaagcct taatgaacca gcaccaggat ccgctggaag ttactcaaga tgtgaccaga 240
 25 gaatgggcta aaaaagttgt ttggaagaga gaaaaggcta gtaagatcaa tgggtgcttat 300
 ttctgtgaag ggcgagttcg aggagaggca atcaggatac gaaccatgaa gatgcgtcaa 360
 caagcttcct tcctaccagc tactttaact atgactgtgg acaagggaga taacgtgaac 420
 atatctttca aaaaggtatt gattaaagaa gaagatgcag tgatttaca aaatggttcc 480
 ttcatccatt cagtgcctcg gcattgaagta cctgatattc tagaagtaca cctgcctcat 540
 gctcagcccc aggatgctgg agtgtactcg gccaggata taggaggaaa cctcttcacc 600
 30 tgggccttca ccaggtgat agtccggaga tgtgaagccc agaagtgggg acctgaatgc 660
 aacctctctt gtactgcttg tatgaacaat ggtgtctgcc atgaagatac tggagaatgc 720
 atttgccctc ctgggtttat gggaaggacg tgtgagaagg cttgtgaact gcacacgttt 780
 ggcagaactt gtaaaagaaag gtgcagtggc acaggctgga aggtcttcca tgtgttctgt 840
 35 ctccctgacc cctatgggtg ttctgtgccc agggcttcca agggcttcca gtgcaatgaa 900
 gcatgccacc ctgggtttta cgggcccagat tgtaagctta ggtgcagctg caacaatggg 960
 gagatgtgtg atcgcttcca aggatgtctc tgctctccag gatggcaggg gctccagtgt 1020
 gagagagaag gcataccgag gatgacccca aagatagtgg atttgccaga tcatatagaa 1080
 gtaaacagtg gtaaatttaa tccatttctg aaagcttctg gctggccgct acctactaat 1140
 40 gaagaaatga ccctgggtgaa gccggttggc acaggtctcc atccaaaaga ctttaaccat 1200
 acggatcatt tctcagtagc catattcacc atccaccgga tccctccccc tgactcagga 1260
 gtttgggtct gcagtgtgaa cacagtggct gggatgggtg aaaagccctt caacatttct 1320
 gttaaagttc ttccaaagcc cctgaatgcc ccaaaccgtg ttgacactgg acataacttt 1380
 gctgtcatca acatcagctc tgagccttac tttggggatg gaccaatcaa atccaaagaa 1440
 45 cttctatata aaccggttaa tcactatgag gcttggcaac atattcaagt gacaaatgag 1500
 attgttacac tcaactattht ggaacctcgg acagaatatg aactctgtgt gcaactgggtc 1560
 cgtcgtggag aggggtgggga agggcatcct ggacctgtga gacgcttcac aacagcttct 1620
 atcggaactc ctccctccaag aggtctaaat ctctgccta aaagtcagac cactctaaat 1680
 ttgacctggc aaccaatatt tccaagctcg gaagatgact tttatgttga agtggagaga 1740
 50 aggtctgtgc aaaaaagtga tcagcagaat attaaagttc caggcaactt gacttcggtg 1800
 ctacttaaca acttacatcc caggagcag tacgtgttcc gagctagagt caacaccaag 1860
 gccagggggg aatggagtga agatctcact gcttggacct ttagtacat tcttctcct 1920
 caaccagaaa acatcaagat ttccaacatt acacactcct cggctgtgat ttcttggaca 1980
 atattggatg gctattctat ttcttctatt actatccgtt acaaggttca aggcaagaat 2040
 55 gaagaccagc acgttgatgt gaagataaag aatgccacca tcatcagta tcagctcaag 2100
 ggccctagagc ctgaaacagc ataccagggt gacatttttg cagagaacaa catagggtca 2160
 agcaaccagc ccttttctca tgaactgggt accctcccag aatctcaagc accagcggac 2220
 ctccggagggg ggaagatgct gcttatagcc atccttggct ctgctggaat gacctgctg 2280
 actgtgctgt tggcctttct gatcatattg caattgaaga gggcaaatgt gcaaaggaga 2340
 atggcccaag ccttccaaaa cgtgagggaa gaaccagctg tgcagttcaa ctcaaggact 2400
 60 ctggccctaa accgaaggt caaaaacaac ccagatccta caatttatcc agtgcctgac 2460
 tggaaatgaca tcaaatctca agatgtgatt ggggagggca attttggcca agttcttaag 2520
 gcgcgcacatc agaaggatgg gttacggatg gatgctgcca tcaaaagaat gaaagaatat 2580

	gcctccaaag	atgacacag	ggactttgca	ggagaactgg	aagttctttg	taaacttggg	2640
	caccatccaa	acatcatcaa	tctcttagga	gcatgtgaac	atcgaggcta	cttgtacctg	2700
	gccattgagt	acgcgcccc	tggaaacctt	ctggacttcc	ttcgcaagag	ccgtgtgctg	2760
5	gagacggacc	cagcatttgc	catttgccaa	agcaccgcgt	ccacactgtc	ctcccagcag	2820
	ctccttcaact	tcgctgccga	cgtggcccg	ggcatggact	acttgagcca	aaaacagttt	2880
	atccacaggg	atctggctgc	cagaaacatt	ttagttgggtg	aaaactatgt	ggcaaaaata	2940
	gcagattttg	gattgtcccg	aggtcaagag	gtgtacgtga	aaaagacaat	gggaaggctc	3000
	ccagtgcgct	ggatggccat	cgagtcaactg	aattacagtg	tgtacacaac	caacagtgat	3060
10	gtatggctct	atgggtgtgt	actatgggag	attgttagct	taggaggcac	accctactgc	3120
	gggatgactt	gtgcagaact	ctacgagaag	ctgccccagg	gctacagact	ggagaagccc	3180
	ctgaactgtg	atgatgaggt	gtatgatcta	atgagacaat	gctggcgagg	gaagccttat	3240
	gagaggccat	catttgccca	gatattgggtg	tccttaaaca	gaatgttaga	ggagcgaaag	3300
	acctacgtga	ataccacgct	ttatgagaag	tttacttatg	caggaattga	ctgttctgct	3360
15	gaagaagcgg	cctag					3375
	<210> 10						
	<211> 2409						
	<212> DNA						
20	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<300>						
25	<302> beta5 integrin						
	<310> X53002						
	<400> 10						
30	ncbsncvwra	tgccgcgggc	cccggcgccg	ctgtacgcct	gcctcctggg	gctctgcgcg	60
	ctcctgcccc	ggctcgcagg	tctcaacata	tgcactagtg	gaagtgcac	ctcatgtgaa	120
	gaatgtctgc	taatccaccc	aaaatgtgcc	tgggtgctcca	aagaggactt	cggaagccca	180
	cggtccatca	cctctcggtg	tgatctgagg	gcaaaccctt	tcaaaaatgg	ctgtggaggt	240
	gagatagaga	cccagccag	cagcttccat	gtcctgagga	gcctgcccct	cagcagcaag	300
	gggtcgggct	ctgcaggctg	ggacgtcatt	cagatgacac	cacaggagat	tgccgtgaac	360
35	ctccggcccc	gtgacaagac	caccttccag	ctacaggttc	gccagggtga	ggactatcct	420
	gtggacctgt	actacctgat	ggacctctcc	ctgtccatga	aggatgactt	ggacaatatc	480
	cggagcctgg	gcaccaaact	cgcgaggagg	atgaggaagc	tcaccagcaa	cttccggttg	540
	ggattttggg	cttttgttga	taaggacatc	tctcctttct	cctacacggc	accgaggtag	600
	cagaccaatc	cgctcatttg	ttaccaaatg	tttccaaatt	gcgtcccctc	ctttgggttc	660
40	cgccatctgc	tgccctcac	agacagagtg	gacagcttca	atgaggaagt	tcggaacag	720
	aggggtgtccc	ggaaccgaga	tgcccctgag	gggggctttg	atgcagtact	ccaggcagcc	780
	gtctgcaagg	agaagattgg	ctggcgaaag	gatgcactgc	atttgctggt	gttcacaaca	840
	gatgatgtgc	cccacatcgc	attggatgga	aaattgggag	gcctgggtgca	gccacacgat	900
	ggccagtgcc	acctgaacga	ggccaacgag	tacacagcat	ccaaccagat	ggactatcca	960
45	tcctctgcct	tgcttggaga	gaaattggca	gagaacaaca	tcaacctcat	ctttgcagtg	1020
	acaaaaaacc	attatatgct	gtacaagaat	tttacagccc	tgatacctgg	aacaacgggtg	1080
	gagatttttag	atggagactc	caaaaatatt	attcaactga	ttattaatgc	atacaatagt	1140
	atccggtcta	aagtggagtt	gtcagctctg	gatcagcctg	aggatcttaa	tctcttcttt	1200
	actgtacct	gccaagatgg	ggtatcctat	cctgggtcaga	ggaagtgtga	gggtctgaag	1260
50	attggggaca	cgcatcttt	tgaaggcttc	ttggaggccc	gaagctgtcc	cagcagacac	1320
	acggagcatg	tgtttgccct	gcggccggtg	ggattccggg	acagcctgga	ggtgggggtc	1380
	acctacaact	gcacgtgcgg	ctgcagcgtg	gggctggaac	ccaacagcgc	caggtgcaac	1440
	gggagcggga	cctatgtctg	cggcctgtgt	gagtgcagcc	ccggctacct	gggcaccagg	1500
	tgcgagtgcc	aggatgggga	gaaccagagc	gtgtaccaga	acctgtgccg	ggaggcagag	1560
55	ggcaagccac	tgtgcagcgg	gcgtggggag	tgcaagctga	accagtgtct	ctgcttcagag	1620
	agcgagtttg	gcaagatcta	tgggcctttc	tgtgagtgcg	acaactcttc	ctgtgccagg	1680
	aacaagggag	tcctctgctc	aggccatggc	gagtgtcact	gcgggggaatg	caagtgccat	1740
	gcaggttaca	tcggggacaa	ctgtaactgc	tcgacagaca	tcagcacatg	ccggggcaga	1800
	gatggccaga	tctgcagcga	gcgtgggcac	tgtctctgtg	ggcagtgcca	atgcacggag	1860
60	ccgggggcct	tgtggggagat	gtgtgagaag	tgccccacct	gcccggatgc	atgcagcacc	1920
	aagagagatt	gcgtcgagtg	cctgctgctc	cactctggga	aacctgacaa	ccagacctgc	1980
	cacagcctat	gcagggatga	ggtgatcaca	tgggtggaca	ccatcgtgaa	agatgaccag	2040

5 gaggctgtgc tatgttttcta caaaaccgccc aaggactgcg tcatgatgtt cacctatgtg 2100
 gagctcccca gtgggaagtc caacctgacc gtcctcaggg agccagagtg tggaaacacc 2160
 cccaacgcca tgaccatcct cctggctgtg gtcggtagca tcctccttgt tgggcttgca 2220
 ctcctgggcta tctggaagct gcttgtcacc atccacgacc ggagggagtt tgcaaagttt 2280
 cagagcgagc gatccagggc ccgctatgaa atggcctcaa atccattata cagaagcct 2340
 atctccacgc acactgtgga cttcaccttc aacaagtcca acaaatccta caatggcact 2400
 gtggactga 2409

10 <210> 11
 <211> 2367
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <300>
 <302> beta3 integrin
 <310> NM000212

20 <400> 11
 atgcgagcgc ggccgcggcc ccggccgctc tgggcgactg tgctggcgct gggggcgctg 60
 gcgggcgttg gcgtaggagg gcccaacatc tgtaccacgc gaggtgtgag ctcttgccag 120
 cagtgcctgg ctgtgagccc catgtgtgcc tgggtgctctg atgaggccct gcctctgggc 180
 tcacctcgct gtgacctgaa ggagaatctg ctgaaggata actgtgcccc agaattccatc 240
 gagttcccag tgagttaggc ccgagtacta gaggacaggc ccctcagcga caagggctct 300
 25 ggagacagct ccaggtcac tcaagtcagt cccagagga ttgcaactcc gctccggcca 360
 gatgattcga agaatttctc catccaagtg cggcaggtgg aggattaccc tgtggacatc 420
 tactacttga tggacctgtc ttactccatg aaggatgac tgtggagcat ccagaacctg 480
 ggtaccaagc tggccacca gatgcgaaag ctccaccagta acctgcggat tggcttcggg 540
 gcatttgtgg acaagcctgt gtcaccatac atgtatatct cccaccagga ggccctcgaa 600
 30 aaccctgct atgatatgaa gaccacctgc ttgcccattg ttggctacaa acacgtgctg 660
 acgctaactg accaggtgac ccgcttcaat gaggaagtga agaagcagag tgtgtcacgg 720
 aaccgagatg cccagagggg tggctttgat gccatcatgc aggctacagt ctgtgatgaa 780
 aagattggct ggaaggaatga tgcattccac ttgctgggtg ttaccactga tgccaagact 840
 catatagcat tggacggaag gctggcaggc attgtccagc ctaatgacgg gcagtgtcat 900
 35 gttggtagtg acaatcatta ctctgcctcc actaccatgg attatccctc tttggggctg 960
 atgactgaga agctatccca gaaaaacatc aatttgatct ttgcagtga tgaaaatgta 1020
 gtcaattctc atcagaacta tagtgagctc atcccaggga ccacagttgg ggttctgtcc 1080
 atggattcca ccaatgtcct ccagctcatt gttgatgctt atgggaaaat ccgttctaaa 1140
 gtagagctgg aagtgcgtga cctccctgaa gagttgtctc tatccttcaa tgccacctgc 1200
 40 ctcaacaatg aggtcatccc tggcctcaag tcttgtatgg gactcaagat tggagacacg 1260
 gtgagcttca gcattgaggg caaggtgcga ggctgtcccc aggagaagga gaagtccttt 1320
 accataaagc ccgtgggctt caaggacagc ctgatcgtcc aggtcacctt tgattgtgac 1380
 tgtgcctgcc aggcccaagc tgaacctaat agccatcgct gcaacaatgg caatgggacc 1440
 45 tttgagtgtg gggatatgccc ttgtgggctc ggctggctgg gatcccagtg tgagtgtca 1500
 gaggaggact atcgcccttc ccagcaggac gaatgcagcc ccggggaggg tcagcccgtc 1560
 tgcagccagc ggggcgagtg cctctgtggt caatgtgtct gccacagcag tgactttggc 1620
 aagatcacgg gcaagtactg cgagtgtgac gacttctcct gtgtccgcta caagggggag 1680
 atgtgtctcag gccatggcca gtgcagctgt ggggactgcc tgtgtgactc cgactggacc 1740
 50 ggctactact gcaactgtac cacgcgtact gacacctgca tgtccagcaa tgggctgctg 1800
 tgcagcggcc gcggcaagtg tgaatgtggc acgtgtgtct gtatccagcc gggctcctat 1860
 ggggacacct gtgagaagtg cccacctgc ccagatgcct gcacctttaa gaaagaatgt 1920
 gtggagtgtg agaagtttga ccgggagccc tacatgaccg aaaataacctg caaccgttac 1980
 tgccgtgacg agattgagtc agtgaaagag ctttaaggaca ctggcaagga tgcagtgaat 2040
 55 tgtacctata agaattgagga tgactgtgtc gtcagattcc agtactatga agattctagt 2100
 ggaaagtcca tctgtatgt ggtagaagag ccagagtgtc ccaagggccc tgacatcctg 2160
 gtggtcctgc tctcagtgat gggggccatt ctgctcattg gccttgccgc cctgtcctc 2220
 tggaaactcc tcatcaccat ccacgaccga aaagaattcg ctaaatttga ggaagaacgc 2280
 gccagagcaa aatgggacac agccaacaac ccactgtata aagaggccac gtctaccttc 2340
 60 accaatatca cgtaccgggg cacttaa 2367

<210> 12

<211> 3147
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5 <300>
<302> alpha v integrin
<310> NM0022210

<400> 12
10 atggccttttc cgcgcggcg acggtgcgc ctcgggtccc gcggcctccc gcttcttctc 60
tcgggactcc tgctacctct gtgcgcgcgc ttcaacctag acgtggacag tcctgcccag 120
tactctggcc ccgagggaag ttacttcggc ttcccgctgg atttcttcgt gccagcgcg 180
tcttcccggg tggttcttct cgtgggagct cccaaagcaa acaccacca gcctgggatt 240
gtggaaggag ggcaggctct caaatgtgac tggctctcta ccgcccgtg ccagccaatt 300
15 gaatttgatg caacaggcaa tagagattat gccaaaggat atccattgga atttaagtcc 360
catcagtggg ttggagcatc tgtgaggtcg aaacaggata aaattttggc ctgtgcccc 420
ttgtaccatt ggagaactga gatgaaacag gagcgagagc ctgttggaac atgcttctct 480
caagatggaa caaagactgt tgagtatgct ccattgtagat cacaagatat tgatgctgat 540
ggacagggat tttgtcaagg aggttcagc attgatttta ctaaagctga cagagtactt 600
20 cttggtgggc ctggtagctt ttattggcaa ggtcagctta ttccggatca agtggcagaa 660
atcgtatcta aatacagccc caatgtttac agcatcaagt ataataacca attagcaact 720
cggactgcac aagctatttt tgatgacagc tatttgggtt attctgtggc tgtcggagat 780
ttcaatgggtg atggcataga tgactttggt tcaggagttc caagagcagc aaggactttg 840
ggaatgggtt atatttatga tgggaagaac atgtcctcct tatacaattt tactggcgag 900
25 cagatggctg catatttcgg attttctgta gctgccactg acattaatgg agatgattat 960
gcagatgtgt ttattggagc acctctcttc atggatcgtg gctctgatgg caaactccaa 1020
gagtgggggc aggtctcagt gtctctacag agagcttcag gagacttcca gacgacaaa 1080
ctgaatggat ttgaggtctt tgcacgggtt ggcagtgcca tagctccttt gggagatctg 1140
gaccaggatg gtttcaatga tattgcaatt gctgtccat atgggggtga agataaaaaa 1200
30 ggaattgttt atatcttcaa tggaagatca acaggcttga acgcagctcc atctcaaatc 1260
cttgaagggc agtgggctgc tcgaagcatc ccaccaagct ttggctattc aatgaaagga 1320
gccacagata tagacaaaaa tggatatcca gacttaattg taggagcttt tgggtgtagat 1380
cgagctatct tatacagggc cagaccagtt atcattgtaa atgctgggtc tgaagtgtac 1440
cctagcattt taaatcaaga caataaaacc tgctcactgc ctggaacagc tctcaaagtt 1500
35 tcctgtttta atgttaggtt ctgcttaaa gcatagggca aaggagtact tcccaggaaa 1560
cttaatttcc aggtggaact tcttttggat aaactcaagc aaaagggagc aattcgacga 1620
gcactgtttc tctacagcag gtcccaagc cactccaaga acatgactat ttcaaggggg 1680
ggactgatgc agtgtgagga attgatagcg tatctgcccc atgaaatctga atttagagac 1740
aaactcactc caattactat ttttatggaa tatcggttgg attatagaac agctgctgat 1800
40 acaacaggct tgcaaccat tcttaaccag ttcacgcctg ctaacattag tcgacaggct 1860
cacattctac ttgactgtgg tgaagacaat gtctgtaaac ccaagctgga agtttctgta 1920
gatagtgatc aaaagaagat ctatattggg gatgacaacc ctctgacatt gattgttaag 1980
gctcagatac aaggagaagg tgcctacgaa gctgagctca tcgtttccat tccactgcag 2040
gctgatttca tcgggggtgt ccgaaacaat gaagccttag caagactttc ctgtgcattt 2100
45 aagacagaaa accaaactcg ccagggtgga tgtgacctg gaaacccaat gaaggctgga 2160
actcaactct tagctggtct tcgtttcagt gtgcaccagc agtcagagat ggatacttct 2220
gtgaaatttg acttacaat ccaaagctca aatctatttg acaaagtaag cccagttgta 2280
tctcacaagg ttgactctgc tgttttagct gcagttgaga taagaggagt ctcgagtctc 2340
gatcatatct ttctccgat tccaaactgg gagcacaagg agaaccctga gactgaagaa 2400
50 gatgttgggc cagttgttca gcacatctat gagctgagaa acaatgggtc aagttcattc 2460
agcaaggcaa tgctccatct tcagtggcct tacaatatata ataataacac tctgttgat 2520
atccttcatt atgatattga tggaccaatg aactgcactt cagatatgga gatcaaccct 2580
ttgagaatta agatctcatc tttgcaaaac actgaaaaga atgacacggg tgccgggcaa 2640
ggtagcggg accatctcat cactaagcgg gatcttgccc tcagtgaagg agatattcac 2700
55 actttgggtt gtggagttgc tcagtgttgc aagattgtct gccaaagtgg gagattagac 2760
agaggaaaga gtgcaatct gtacgtaaag tcattactgt ggactgagac ttttatgaat 2820
aaagaaaatc agaatcattc ctattctctg aagtcgtctg cttcatttaa tgtcatagag 2880
tttccttata agaactctcc aattgaggat atcaccaact ccacattggt taccactaat 2940
gtcaccctgg gacttcagcc agcggccatg cctgtgcctg tgtgggtgat cattttagca 3000
60 gttctagcag gattgttgc actggctgtt ttggattttg taatgtacag gatgggcttt 3060
tttaaacggg tccggccacc tcaagaagaa agcagcttca acctcatgaa 3120
aatgggtgaag gaaactcaga aacttaa 3147

<210> 13
<211> 402
5 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> CaSm (cancer associated SM-like oncogene)
10 <310> AF000177

<400> 13
atgaactata tgcctggcac cgccagcctc atcgaggaca ttgacaaaaa gcacttggtt 60
ctgcttcgag atggaaggac acttataggc tttttaagaa gcattgatca atttgcaaac 120
15 ttagtgctac atcagactgt ggagcgtatt catgtgggca aaaaatacgg tgatattcct 180
cgagggattt ttgtggctcag aggagaaaat gtggctctac taggagaaat agacttgga 240
aaggagagtg acacaccctt ccagcaagta tccattgaag aaattctaga agaacaaagg 300
gtggaacagc agaccaagct ggaagcagag aagttgaaag tgcaggccct gaaggaccga 360
20 ggtctttcca ttctctgagc agatactctt gatgagtact aa 402

<210> 14
<211> 1923
25 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> c-myb
30 <310> NM005375

<400> 14
atggcccgaa gaccccgga cagcatatat agcagtgcag aggatgatga ggactttgag 60
atgtgtgacc atgactatga tgggctgctt cccaagtctg gaaagcgtca cttggggaaa 120
35 acaagggtgga cccgggaaga ggatgaaaaa ctgaagaagc tgggtggaaca gaatggaaca 180
gatgactgga aagttattgc caattatctc ccgaatcgaa cagatgtgca gtgccagcac 240
cgatggcaga aagtactaaa ccctgagctc atcaagggtc cttggaccaa agaagaagat 300
cagagagtga tagagcttgt acagaaatc agggagaggt ggcataacca cttgaatcca 420
cacttaaagg ggagaattgg aaaacaatgt agggagaggt ggcataacca cttgaatcca 420
40 gaagttaaga aaacctcctg gacagaagag gaagacagaa ttatttaccg ggcacacaa 480
agactgggga acagatgggc agaaatcgca aagctactgc ctggacgaac tgataatgct 540
atcaagaacc actggaattc tacaatgcgt cggaaggctc aacaggaagg ttatctgcag 600
gagtccttcaa aagccagcca gccagcagtg gccacaagct tccagaagaa cagtcatttg 660
atggggtttt ctacaggctc gccacagct caactccctg ccactggcca gccactggtt 720
aacaacgact attcctatta ccacatttct gaagcacaaa atgtctccag tcatgttcca 780
45 taccctgtag cgttacatgt aaatatagtc aatgtccctc agccagctgc cgcagccatt 840
cagagacact ataattgatga agaccctgag aaggaaaagc gaataaagga attagaattg 900
ctcctaattg caaccgagaa tgagctaaaa ggacagcagg tgctaccaac acagaaccac 960
acatgcagct accccgggtg gcacagcacc accattgccg accacaccag acctcatgga 1020
50 gacagtgcac ctgtttcctg tttgggagaa caccactcca ctccatctct gccagcggat 1080
cctggctccc tacctgaaga aagcgcctcg ccagcaaggt gcatgatcgt ccaccagggc 1140
accattctgg ataattgtaa gaacctctta gaatttgag aaacactcca atttatagat 1200
tctttcttaa acacttccag taacctgaa aactcagact tggaaatgcc ttctttaact 1260
tccacccccc tcattgggtc caaattgact gttacaacac catttcatag agaccagact 1320
55 gtgaaaactc aaaaggaaaa tactgttttt agaaccacag ctatcaaaag gtcaattcta 1380
gaaagctctc caagaactcc tacaccattc aaacatgcac ttgcagctca agaaattaaa 1440
tacgggtccc tgaagatgct acctcagaca ccctctcatc tagtagaaga tctgcaggat 1500
gtgatcaaac aggaattctga tgaattctgga tttgtgtctg agtttcaaga aaatggacca 1560
cccttactga agaaaatcaa acaagaggtg gaatctccaa ctgataaatc aggaaacttc 1620
ttctgctcac accactggga aggggacagt ctgaataccc aactgttcac gcagacctcg 1680
60 cctgtgcgag atgcaccgaa tattcttaca agtccggtt taatggcacc agcatcagaa 1740
gatgaagaca atgttctcaa agcatttaca gtacctaaaa acagggtccct ggcgagcccc 1800
ttgcagcctt gtagcagtag ctgggaacct gcacacctgtg gaaagatgga ggagcagatg 1860

acatcttcca gtcaagctcg taaatacgtg aatgcattct cagcccggac gctgggtcatg 1920
 tga 1923

5 <210> 15
 <211> 544
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <302> c-myc
 <310> J00120

15 <400> 15
 gacccccgag ctgtgctgct cgcggcgccg accgcggggc cccggccgct cctgggtccc 60
 ctctgcctc gagaagggca gggcttctca gaggtttggc gggaaaaaga acggagggag 120
 ggatcgcgct gagtataaaa gccgggttttc ggggttttat ctaactcgct gtagtaattc 180
 cagcgagagg cagagggagc gagcgggcgg ccggctaggg tggagagacc gggcgagcag 240
 agctgcgctg cgggcgtcct gggaagggag atccggagcg aatagggggc ttcgcctctg 300
 20 gcccagccct ccgctgctc cccagccag cggtccgcaa cccttgccgc atccacgaaa 360
 ctttgcccat agcagcgggc gggcactttg cactggaact tacaacacc gagcaaggac 420
 ggcactctcc cgacgcgggg aggctattct gccatttgg ggacacttcc ccgccgctgc 480
 caggaccgac ttctctgaaa ggctctcctt gcagctgctt agacgctgga tttttttcgg 540
 gtag 544

25 <210> 16
 <211> 618
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> ephrin-A1
 <310> NM004428

35 <400> 16
 atggagttcc tctgggcccc tctcttgggt ctgtgctgca gtctggccgc tgctgatcgc 60
 cacaccgtct tctggaacag ttcaaattcc aagtccgga atgaggacta caccatacat 120
 40 gtgcagctga atgactacgt ggacatcatc tgtccgcact atgaagatca ctctgtggca 180
 gacgctgcca tggagcagta catactgtac ctggtggagc atgaggagta ccagctgtgc 240
 cagccccagt ccaaggacca agtccgctgg cagtgaacc ggcccagtgcc caagcatggc 300
 ccggagaagc tgtctgagaa gttccagcgc ttcacacctt tcaccctggg caaggagtgc 360
 aaagaaggac acagctacta ctacatctcc aaaccatcc accagcatga agaccgctgc 420
 ttgaggttga aggtgactgt cagtggcaaaa atcactcaca gtctcaggc ccattgtcaat 480
 45 ccacaggaga agagacttgc agcagatgac ccagaggtgc gggttctaca tagcatcggg 540
 cacagtgtcg cccacgcctt cttcccactt gcctggactg tgctgtctct tccacttctg 600
 ctgctgcaaa ccccgtag 618

50 <210> 17
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55 <400> 17
 atggcgcccc cgcagcgccc gctgctcccg ctgctgctcc tgctgttacc gctgccgcgc 60
 ccgcccctcg cgcgcgcgca ggacgcgcgc cgcgcgaact cggaccgcta cgccgtctac 120
 tggaaaccgca gcaaccccag gttccacgca ggcgcggggg acgacggcgg gggctacacg 180
 gtggaggtga gcatcaatga ctacctggac atctactgcc cgcactatgg ggcgcgcgctg 240
 60 ccgcccggcg agcgcatgga gcactacgtg ctgtacatgg tcaacggcga gggccacgcc 300
 tcctgcgacc accgccagcg cggcttcaag cgctgggagt gcaaccggcc cgcggcgccc 360
 gggggggcgc tcaagttctc ggagaagttc cagctcttca cgccttctc cctgggcttc 420

```

gagttccggc cgggccacga gtattactac atctctgcca cgcctcccaa tgctgtggac 480
cggccctgcc tgcgactgaa ggtgtacgtg cggccgacca acgagaccct gtacgaggct 540
cctgagccca tcttcaccag caataactcg tgtagcagcc cgggcggtg cgcctcttc 600
ctcagcacca tccccgtgct ctggaccctc ctgggttctt ag 642
5

<210> 18
<211> 717
<212> DNA
10 <213> Homo sapiens

<300>
<302> ephrin-A3
<310> XM001787
15

<400> 18
atggcggcgg ctccgctgct gctgctgctg ctgctcgtgc ccgtgccgct gctgccgctg 60
ctggcccaag ggcccgagg ggcgctggga aaccggcatg cgggtgtactg gaacagctcc 120
aaccagcacc tgcggcgaga gggctacacc gtgcagggtga acgtgaacga ctatctggat 180
20 atttactgcc cgcactacaa cagctcgggg gtgggccccg gggcgggacc gggggccgga 240
ggcgggggcag agcagtacgt gctgtacatg gtgagccgca acggctaccg cacctgcaac 300
gccagccagg gcttcaagcg ctgggagtg c aaccggccgc acgccccgca cagccccatc 360
aagttctcgg agaagttcca gcgctacagc gccttctctc tgggctacga gttccacgcc 420
ggccacgagt actactacat ctccacgccc actcacaacc tgcactggaa gtgtctgagg 480
25 atgaaggtgt tcgtctgctg cgcctccaca tcgactccg gggagaagcc ggtccccact 540
ctccccagat tcaccatggg cccaatatg aagatcaacg tgctggaaga ctttgaggga 600
gagaaccctc aggtgcccga gcttgagaag agcatcagcg ggaccagccc caaacgggaa 660
cacctgcccc tggcgtggg catgccttc ttcctcatga cgttcttggc ctccctag 717
30

<210> 19
<211> 606
<212> DNA
35 <213> Homo sapiens

<300>
<302> ephrin-A3
<310> XM001784

40 <400> 19
atgcggctgc tgcccctgct gcggactgtc ctctgggccc cgttctctcg ctccccctctg 60
cgcgggggct ccagcctccg ccacgtagtc tactggaact ccagtaaccc caggttgctt 120
cgaggagacg ccgtgggtga gctgggcctc aacgattacc tagacattgt ctgccccac 180
tacgaaggcc cagggccccc tgagggcccc gagacgtttg ctttgtacat ggtggactgg 240
45 ccaggctatg agtcctgcca ggcagagggc ccccgggcct acaagcgctg ggtgtgctcc 300
ctgccctttg gccatgttca attctcagag aagattcagc gcttcacacc cttctccctc 360
ggctttgagt tcttacctgg agagacttac tactacatct cggtgccac tccagagagt 420
tctggccagt gcttgaggct ccagggtgtc gtctgctgca aggagaggaa gtctgagtca 480
gcccacctctg ttgggagccc tggagagagt ggcacatcag ggtggcgagg gggggacact 540
50 cccagccccc tctgtctctt gctattactg ctgcttctga ttcttcgtct tctgcgaatt 600
ctgtga 606

<210> 20
55 <211> 687
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
60 <302> ephrin-A5
<310> NM001962

```

<400> 20						
	atgttgccag	tggagatggt	gacgctgggtg	tttctgggtgc	tctggatgtg	tgtgttcagc 60
	caggaccg	gctccaaggc	cgtcgcccgc	cgctacgctg	tctactggaa	cagcagcaac 120
	cccagattcc	agaggggtga	ctaccatatt	gatgtctgta	tcaatgacta	cctggatggt 180
5	ttctgccctc	actatgagga	ctccgtccca	gaagataaga	ctgagcgcta	tgtcctctac 240
	atgggtgaact	ttgatggcta	cagtgcctgc	gaccacactt	ccaaaggggt	caagagatgg 300
	gaatgtaacc	ggcctcactc	tccaaatgga	ccgctgaagt	tctctgaaaa	attccagctc 360
	ttcactccct	tttctctagg	atttgaattc	aggccaggcc	gagaatattt	ctacatctcc 420
	tctgcaatcc	cagataatgg	aagaagggtcc	tgtctaaagc	tcaaagtctt	tgtgagacca 480
10	acaaatagct	gtatgaaaac	tataggtggt	catgatcggt	ttttcgatgt	taacgacaaa 540
	gtagaaaatt	cattagaacc	agcagatgac	accgtacatg	agtcagccga	gccatcccgc 600
	ggcgagaacg	cggcacaac	accaaggata	cccagccgcc	ttttggcaat	cctactgttc 660
	ctcctggcga	tgcttttgac	attatag			687
15	<210> 21					
	<211> 2955					
	<212> DNA					
	<213> Homo sapiens					
20	<400> 21					
	atggccctgg	attatctact	actgctcctc	ctggcatccg	cagtggctgc	gatggaagaa 60
	acgttaaatg	acaccagaac	ggctactgca	gagctgggct	ggacggccaa	tcctgcgctc 120
	gggtgggaag	aagtacgtgg	ctacgatgaa	aacctgaaca	ccatccgcac	ctaccagggtg 180
25	tgcaatgtct	tcgagcccaa	ccagaacaat	tggtctgtca	ccaccttcat	caaccggcgg 240
	ggggcccatc	gcactctacac	agagatgcgc	ttcactgtga	gagactgcag	cagcctccct 300
	aatgtcccag	gatcctgcaa	ggagaccttc	aacttggtatt	actatgagac	tgactctgtc 360
	attgccacca	agaagtcagc	cttctgggtc	gaggccccc	acctcaaagt	agacaccatt 420
	gctgcagatg	agagcttctc	ccagggtggac	tttgggggaa	ggctgatgaa	ggtaaacaca 480
30	gaagtcagga	gctttggggc	tcttactcgg	aatgggtttt	acctcgcttt	tcaggattat 540
	ggagcctgta	tgtctcttct	ttctgtccgt	gtcttcttca	aaaagtgtcc	cagcattgtg 600
	caaaattttg	cagtgtttcc	agagactatg	acaggggcag	agagcacatc	tctgggtgatt 660
	gctcggggca	catgcatccc	caacgcagag	gaagtggacg	tgcccatcaa	actctactgc 720
	aacgggggatg	gggaatggat	ggtgcctatt	gggcgatgca	cctgcaagcc	tggttatgag 780
35	cctgagaaca	gcgtggcatg	caaggcttgc	cctgcaggga	cattcaaggc	cagccaggaa 840
	gctgaaggct	gctcccactg	ccccctcaac	agccgctccc	ctgcagaggc	gtctcccatc 900
	tgacacctgtc	ggaccgggta	ttaccgagcg	gactttgacc	ctccagaagt	ggcatgcact 960
	agcgtcccat	caggtccccc	caatgtttatc	tccatcgta	atgagacgtc	catcattctg 1020
	gagtgccacc	ctccaaggga	gacagggtggg	cgggatgatg	tgacctacaa	catcatctgc 1080
40	aaaaagtgcc	gggcagaccg	ccggagctgc	tcccgctgtg	acgacaatgt	ggagtttgtg 1140
	cccaggcagc	tgggcctgac	ggagtgccgc	gtctccatca	gcagcctgtg	ggcccacacc 1200
	ccctacacct	ttgacatcca	ggccatcaat	ggagttctcca	gcaagagtcc	cttcccccca 1260
	cagcacgtct	ctgtcaacat	caccacaac	caagccggcc	cctccaccgt	tcccatcatg 1320
	caccaagtca	gtgccactat	gaggagcatc	accttgatc	ggccacagcc	ggagcagccc 1380
45	aatggcatca	tcctggacta	tgagatccgg	tactatgaga	aggaacacaa	tgagttcaac 1440
	tcctccatgg	ccaggagtca	gaccaaacaca	gcaaggattg	atgggctgcg	gcctggcatg 1500
	gtatatgtgg	tacagggtgcg	tgcccgcact	gttgctggct	acggcaagtt	cagtggcaag 1560
	atgtgcttcc	agactctgac	tgacgatgat	tacaagtcag	agctgaggga	gcagctgccc 1620
	ctgattgctg	gctcggcagc	ggccgggggtc	gtgttcgttg	tgtccttggt	ggccatctct 1680
50	atcgtctgta	gcaggaaacg	ggcttatagc	aaagaggctg	tgtacagcga	taagctccag 1740
	cattacagca	caggccgagg	ctccccagg	atgaagatct	acattgaccc	cttcacttat 1800
	gaggatccca	acgaagctgt	ccgggagttt	gccaaaggaga	ttgatgtatc	ttttgtgaaa 1860
	attgaagagg	tcacgaggc	aggggagttt	ggagaagtgt	acaagggggc	tttgaaactg 1920
	ccaggcaaga	gggaaatcta	cgtggccatc	aagaccctga	aggcagggtg	ctcggagaag 1980
55	cagcgtcggg	actttctgag	tgaggcgagc	atcatgggcc	agttcgacca	tcctaacatc 2040
	attcgctctg	aggggtgtgg	caccaagagt	cgccctgtca	tgatcatcac	agagttcatg 2100
	gagaatgggt	cattggattc	tttctctcag	caaaatgacg	ggcagttcac	cgtgatccag 2160
	cttgtgggta	tgctcagggg	catcgctgct	ggcatgaagt	acctggctga	gatgaattat 2220
	gtgcacggg	acctggctgc	taggaacatt	ctgggtcaaca	gtaacctggt	gtgcaagggtg 2280
60	tcgcactttg	gcctctcccg	ctacctccag	ctgacacact	cagatcccac	ctacaccagc 2340
	tccttggggg	ggaagatccc	tgtgagatgg	acagctccag	aggccatcgc	ctaccgcaag 2400
	ttcacttcag	ccagcgacgt	ttggagctat	gggatcgta	tgtgggaagt	catgtcattt 2460

5 ggagagagac cctattggga tatgtccaac caagatgtca tcaatgccat cgagcaggac 2520
 taccggctgc cccaccccat ggactgtcca gctgctctac accagctcat gctggactgt 2580
 tggcagaagg accggaacag ccggccccgg tttgcggaga ttgtcaacac cctagataag 2640
 atgatccgga acccggaag tctcaagact gtggcaacca tcaccgccgt gccttcccag 2700
 cccctgctcg accgtccat ccagacttc acggccttta ccaccgtgga tgactggctc 2760
 agcgccatca aaatgggtcca gtacagggac agcttcctca ctgctggctt cactccctc 2820
 cagctggtca ccagatgac atcagaagac ctctgagaa taggcatac cttggcaggc 2880
 catcagaaga agatcctgaa cagcattcat tctatgaggg tccagataag tcagtcacca 2940
 acggcaatgg catga 2955
 10
 <210> 22
 <211> 3168
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 atggctctgc ggaggctggg ggccgcgctg ctgctgctgc cgctgctcgc cgccgtggaa 60
 20 gaaacgctaa tggactccac tacagcgact gctgagctgg gctggatggg gcaccccca 120
 tcagggctggg aagaggtgag tggctacgat gagaacatga acacgatccg cacgtaccag 180
 gtgtgcaacg tgtttgagtc aagccagaac aactggctac ggaccaagt tatccggcgc 240
 cgtggcgccc accgcatcca cgtggagatg aagttttcgg tgcgtgactg cagcagcatc 300
 cccagcgtgc ctggctcctg caaggagacc ttcaacctct attactatga ggctgacttt 360
 25 gactcggcca ccaagacctt ccccaactgg atggagaatc catgggtgaa ggtggatacc 420
 attgacgccc acgagagctt ctcccagggtg gacctgggtg gccgcgtcat gaaaatcaac 480
 accgaggtgc ggagcttcgg acctgtgtcc cgcagcggct tctacctggc cttccaggac 540
 tatggcggtc gcactgtccct catcgccgtg cgtgtcttct accgcaagtg ccccgcatc 600
 atccagaatg gcgcatctt ccaggaaacc ctgtcggggg ctgagagcac atcgctggtg 660
 30 gctgcccggg gcagctgcat cgccaatgag gaagaggtgg atgtacctat caagctctac 720
 tgtaacgggg acggcgagtg gctggtgccc atcgggcgct gcatgtgcaa agcaggcttc 780
 gaggccggtg agaatggcac cgtctgccga ggtgtccat ctgggacttt caaggccaac 840
 caaggggatg aggcctgtac ccactgtccc atcaacagcc ggaccacttc tgaaggggccc 900
 accaactgtg tctgccgcaa tggctactac gtgatttcca gtgtcaatga gacctccctc 1020
 35 tgcacaacca tcccctccgc gcccaggct ggaggccgag aggacctcgt ctacaacatc 1080
 atgtggaggt ggacccctcc ccgcgactcc ggaggccgag gctgcagccc gctgcgggga caatgtacag 1140
 atctgcaaga gctgtggctc gggccgggggt gcctgcaccc acatcagtgga cctgctggcc 1200
 tacgcaaccac gccagctagg cctgaccgag gatccaggct gtgaacggcg ttactgacca gagccccctc 1260
 40 cacaccagat acaccttcca gatccaggct accaaccagg cagctccatc ggcaagtgtc 1320
 tcgctcagat aggtgagccg caccgtggac agcattaccc tgtcgtggtc ccagccagac 1380
 atcatgcatc aggtgagccg ggactatgag ctgcagtact atgagaagga gctcagttag 1440
 cagcccaatg gcgtgatcct ggactatgag ctgcagtact atgagaagga gctcagttag 1440
 tacaacgcca cagccataaa aagccccacc aacacgggtc ccgtgcaggg cctcaaagcc 1500
 ggcgccatct atgtcttcca ggtgcccggc cgacccgtgg caggctacgg gcgctacagc 1560
 45 ggcaagatgt acttccagac catgacagaa gccgagtacc agacaagcat ccaggagaag 1620
 ttgccactca tcatcggtc acgggggttt gagcgtgctg actcggagta caccggacaag 1740
 atcgccatcg tgtgtaacag acgggggttt ccacatgacc ccaggcatga agatctacat cgatcctttc 1800
 ctgcaaacact acaccagtgg ccacatgacc ccaggcatga agatctacat cgatcctttc 1800
 acctacgagg accccaacga ggcagtgcgg gagtttgcca aggaaattga catctcctgt 1860
 50 gtcaaaattg agcaggtgat cggagcaggg gagtttgccg aggtctgcag tggccacctg 1920
 aagctgccag gcaagagaga gatctttgtg gccactaaga cgctcaagtc gggctacacg 1980
 gagaagcagc gccgggactt cctgagcgaa gcctccatca tgggccaagt cgacctccc 2040
 aacgtcatcc acctggaggg tgtcgtgacc aagagcacac ctgtgatgat catcaccgag 2100
 ttcatggaga atggctccct ggactccttt ctccggcaaa acgatgggca gttcacagtc 2160
 55 atccagctgg tgggcatgct tcggggcatc gcagctggca tgaagtacct ggcagacatg 2220
 aactatgttc accgtgacct ggctgcccgc aacatcctcg tcaacagcaa cctggctcgc 2280
 aaggtgtcgg actttgggct ctacagggag ctatagggag atacctcaga cccacctac 2340
 accagtgcgc tgggcccgaat gatccccatc cgctggagacg ccccggaagc catccagtac 2400
 cggaagttca cctcggccag tgatgtgtgg agctacggca ttgtcatgtg ggaggtgatg 2460
 60 tcctatgggg agcggcccta ctgggacatg accaaccagg atgtaataaa tgccattgag 2520
 caggactatc ggaaggaccg gccattggag tgcggcagcg ccctgcacca actcatgctg 2580
 gactgttggc agaagaccg caaccacgg cccaagttcg gccaaattgt caacacgcta 2640
 gacaagatga tccgcaatcc caacagcctc aaagccatgg cgccctctc ctctggcattc 2700

	aacctgccgc	tgctggaccg	cacgatcccc	gactacacca	gctttaaacac	ggtggacgag	2760
	tggtctggagg	ccatcaagat	ggggcagtac	aaggagagct	tcgccaatgc	cggcttcacc	2820
	tcctttgacg	tcgtgtctca	gatgatgatg	gaggacattc	tccgggttgg	ggtcactttg	2880
	gctggccacc	agaaaaaat	cctgaacagt	atccagggtga	tccggggcgca	gatgaaccag	2940
5	attcagtctg	tggaggggcca	gccactcgcc	aggaggccac	ggggccacggg	aagaaccaag	3000
	cggtgccagc	cacgagacgt	caccaagaaa	acatgcaact	caaacgacgg	aaaaaaaaag	3060
	ggaatgggaa	aaaagaaaac	agatcctggg	agggggcggg	aaatacaagg	aatatTTTTT	3120
	aaagaggatt	ctcataagga	aagcaatgac	tgttcttgcg	ggggataa		3168
10	<210> 23						
	<211> 2997						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<400> 23						
	atggccagag	cccgcccgcc	gcgcgcgcgc	tcgcgcgcgc	cggggcttct	gccgctgctc	60
	cctccgctgc	tgctgctgcc	gctgctgctg	ctgcccgcgc	gctgccgggc	gctggaagag	120
	accctcatgg	acacaaaatg	ggtaacatct	gagttggcgt	ggacatctca	tccagaaagt	180
20	gggtgggaag	aggtgagtg	ctacgatgag	gccatgaatc	ccatccgcac	ataccagggtg	240
	tgtaatgtgc	gcgagtcaag	ccagaacaac	tggtctcgca	cgggggttcat	ctggcgcgcg	300
	gatgtgcagc	gggtctacgt	ggagctcaag	ttcactgtgc	gtgactgcaa	cagcatcccc	360
	aacatccccg	gctcctgcaa	ggagaccttc	aacctcttct	actacgaggg	tgacagcgat	420
	gtggcctcag	cctcctcccc	cttctggatg	gagaaccctt	acgtgaaagt	ggacaccatt	480
25	gcacccgatg	agagcttctc	gcggctggat	gcgggcgctg	tcaacaccaa	ggtgcgcagc	540
	tttggggccac	tttccaaggc	tggtcttctac	ctggccttcc	aggaccaggg	cgcctgcatg	600
	tcgctcatct	ccgtgcgcgc	cttctacaag	aagtgtgcat	ccaccaccgc	aggcttcgca	660
	ctcttccccg	agaccctcac	tggggcggag	cccacctcgc	tggtcattgc	tcctggcacc	720
	tgcatcccta	gaggtgtgga	gggtgtcggtg	ccactcaagc	tctactgcaa	cggcgatggg	780
30	gagtggtatg	tgctgtggg	tgctgtcacc	tgtgccaccg	gccatgagcc	agctgccaag	840
	gagtccaggt	gcccgccttg	tccccctggg	agctacaagg	cgaagcaggg	agagggggccc	900
	tgcttcccat	gtccccccaa	cagccgtacc	acctccccag	ccgccagcat	ctgcacctgc	960
	cacaataact	tctaccgtgc	agactcggac	tctgcccaga	gtgcctgtac	caccgtgcca	1020
	tctccacccc	ctccaatgtg	ctccaatgtg	atggaacact	caactgacct	cgagtggagt	1080
35	gagccccggg	acctgggtgt	ccgggatgac	ctcctgtaca	atgtcatctg	caagaagtgc	1140
	catggggctg	gaggggcctc	agcctgtctc	cgctgtgatg	acaacgtgga	gtttgtgect	1200
	cggcagctgg	gcctgtcgga	gccccgggtc	cacaccagcc	atctgctggc	ccacacgcgc	1260
	tacacctttg	aggtgcaggc	ggtcaacggt	gtctcgggca	agagccctct	gccgcctcgt	1320
	tatgcggcgg	tgaatatcac	cacaaaccag	gctgccccgt	ctgaagtgcc	cacactacgc	1380
40	ctgcacagca	gctcaggcag	cagcctcacc	ctatcctggg	cacccccaga	gcggcccaac	1440
	ggagtcatcc	tggactacga	gatgaagtac	tttgagaaga	gcgagggcat	cgcctccaca	1500
	gtgaccagcc	agatgaactc	cgtgcagctg	gacgggcttc	ggcctgacgc	ccgctatgtg	1560
	gtccagggtc	gtgcccgcac	agtagctggc	tatgggcagt	acagccgccc	tgccgagttt	1620
	gagaccacaa	gtgagagagg	ctctggggcc	cagcagctcc	aggagcagct	tccccctcatc	1680
45	gtgggctccg	ctacagctgg	gcttgtcttc	gtgggtggctg	tcgtgggtcat	cgctatcgctc	1740
	tgcttcagga	agcagcgaca	cggctctgat	tcggagtaca	cggagaagct	gcagcagtac	1800
	attgtctctg	gaatgaagg	ttatattgac	ccttttacct	acgaggaccc	taatgaggct	1860
	gttcgggagt	ttgccaagga	gatcgacgtg	tcttgcgtca	agatcgagga	ggtgatcgga	1920
	gctggggaa	ttggggaagt	gtgccgtggt	cgactgaaac	agcctggccg	ccgagaggtg	1980
50	tttctggcca	tcaagacgct	gaaggtgggc	tacaccgaga	ggcagcggcg	ggacttctcta	2040
	agcgaggcct	ccatcatggg	tcagtttgat	caccccaata	taatccggct	cgagggcgtg	2100
	gtcaccaaaa	gtcggccagt	tatgatcttc	actgagttca	tggaaaactg	cgccttgagc	2160
	tccttctctc	ggctcaacga	tgggcagttc	acggctcatc	agctgggtggg	catgttgccg	2220
	ggcattgctg	ccggcatgaa	gtacctgtcc	gagatgaact	atgtgcaccg	cgacctggct	2280
55	gctcgcacaa	tccttgtcaa	cagcaacctc	gtctgcaaag	tctcagactt	tggcctctcc	2340
	cgtcttctgg	aggatgacct	ctccgatcct	acctacacca	gttccctggg	cgggaagatc	2400
	cccatccgct	ggactgcccc	agaggccata	gcctatcgga	agttcacttc	tgctagtgtat	2460
	gtctggagct	acggaattgt	catgtgggag	gtcatgagct	atggagagcg	accctactgg	2520
	gacatgagca	accaggatgt	catcaatgcc	gtggagcagg	attaccggct	gccaccaccc	2580
60	atggactgtc	ccacagcact	gcaccagctc	atgctggact	gctgggtgcg	ggaccggaac	2640
	ctcaggccca	aattctccca	gattgtcaat	accctggaca	agctcatccg	caatgctgcc	2700
	agcctcaagg	tcattgcccag	cgctcagctc	ggcatgtcac	agccccctct	ggaccgcacg	2760

gtcccagatt acacaacctt caccagagtt ggtgattggc tggatgccat caagatgggg 2820
 cggtagaagg agagcttcgt cagtgcgggg tttgcatcct ttgacctggg ggcccagatg 2880
 acggcagaag acctgctccg tattgggggtc accctggccg gccaccagaa gaagatcctg 2940
 agcagtatcc aggacatgcg gctgcagatg aaccagacgc tgccctgtgca ggtctga 2997
 5
 <210> 24
 <211> 2964
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 atggagctcc ggggtgctgct ctgctgggct tcgttggccg cagcttttga agagaccctg 60
 ctgaacacaa aattggaaac tgctgatctg aagtgggtga cattccctca ggtggacggg 120
 15 cagtgggagg aactgagcgg cctggatgag gaacagcaca gcgtgcgcac ctacgaagtg 180
 tgtgaagtgc agcgtgcccc gggccaggcc cactggcttc gcacaggttg ggtccacgg 240
 cggggcgccg tccacgtgta cgccacgctg cgcttcacca tgctcgagtg cctgtccctg 300
 cctcgggctg ggcgctcctg caaggagacc ttcacgctct tctactatga gagcgatgcg 360
 20 gacacggcca cggccctcac gccagcctgg atggagaacc cctacatcaa ggtggacacg 420
 gtggccgcgg agcatctcac ccggaagcgc cctggggccg agggccaccg gaaggtgaat 480
 gtcaagacgc tgcgtctggg accgctcagc aaggctggct tctacctggc cttccaggac 540
 caggggtgct gcatggccct gctatccctg cactcttctt acaaaaagtg cgccagctg 600
 actgtgaacc tgaactcgatt cccggagact gtgcctcggg agctgggtgt gcccggtggc 660
 25 ggtagctgcg tgggtggatgc cgtccccgcc cctggcccca gcccagcct ctactgccgt 720
 gaggatggcc agtggggcca acagccggctc acgggctgca gctgtgctcc ggggttcgag 780
 gcagctgagg ggaacaccaa gtgccgagcc tgtgccagg gcaccttcaa gcccctgtca 840
 ggagaagggt cctgccagcc atgccagcc aatagccact ctaacaccat tggatctgcc 900
 gtctgccagt gccgcgtcgg ggacttccgg gcacgcacag acccccgggg tgcaccctgc 960
 30 accaccctc cttcggtcc gccggagcgt gtttccccgc tgaacggctc ctccctgcac 1020
 ctggaatgga gtgccccctt ggagctcgtt ggccgagagg acctaccta cgccctccgc 1080
 tgccgggagt gccgaccggg aggtcctctg gcgccttgcg ggggagacct gacttttgac 1140
 cccggccccc gggacctggg ggagccctgg gtgggtggtt gagggctacg tccggacttc 1200
 acctatacct ttgagtgac tgcattgaac tctgagccac ccttagccac ggggcccgtc 1260
 35 ccatttgagc ctgtcaatgt caccactgac cgagaggtag ctctgcagt cctctgcac 1320
 cgggtgacgc ggtcctcacc cagcagcttg agcctggcct gggctgttcc ccgggacccc 1380
 agtggggcgt ggctggacta cgaggtcaaa taccatgaga agggcgccga gggctccagc 1440
 agcgtgcggt tcctgaagac gtcagaaaac cgggcagagc tgcgggggct gaagcgggga 1500
 gccagctacc gtgtgcaggt acggggcgcg tctgagggcg gctacgggccc cttcgggcag 1560
 40 gaacatcaca gccagaccca actggatgag agcgagggct ggcgggagca gctggccctg 1620
 attgcgggca cggcagtcgt ggggtgtggtc ctggctcctg ttggtcattgt ggtcgagtt 1680
 ctctgcctca ggaagcagag caatgggaga gaagcagaat attcggaaca acacggacag 1740
 tatctcatcg gacatggtac taaggtctac atcgaccctt tcaattatga agaccctaata 1800
 gaggtgtgta gggaatttgc aaaagagatc gatgtctcct acgtcaagat tgaagaggtg 1860
 45 attgggtgag gtgagtttgg cgaggtgtgc cggggggcgg tcaaggcccc agggaagaag 1920
 gagagctgtg tggcaatcaa gaccctgaag ggtggctaca cggagcggca gcggcgtgag 1980
 tttctgagcg aggcctccat catggggcag ttccagcacc ccaatatcat ccgcctggag 2040
 ggcgtggtca ccaacagcat gcccgctcatg attctcacag agttcatgga gaacggcgcc 2100
 ctggactcct tcctgcggct aaacgcagga cagttcacag tcatccagct cgtgggcatg 2160
 50 ctgcggggca tcgctcggg catgcggtac cttgcggaga tgagctacgt ccaccogagac 2220
 ctggctgctc gcaacatcct agtcaacagc aacctcgtct gcaaaagtgtc tgactttggc 2280
 ctttcccgat tcctggagga gaactcttcc gatccacct acacgagctc cctgggagga 2340
 aagattccca tccgatggac tgccccggag gccattgcct tccggaagtt cacttccgcc 2400
 agtgatgcct ggagttacgg gattgtgatg tgggaggtga tgtcatttgg ggagaggccg 2460
 tactgggaca ttagcaatca ggacgtgatc aatgccattg aacaggacta ccggttgccc 2520
 55 ccgccccag agtctccac ctccctccac cagctcatgc tggactgttg gcagaagac 2580
 cggaatgccc ggccccgctt cccccaggtg gtcagcgccc tggacaagat gatccggaac 2640
 cccgccagcc tcaaaatcgt ggcccgggag aatggcgggg cctcacaccc tctcctggac 2700
 cagcggcagc ctcaactact acgaagcccc tttcgcagcc gctggcttgg agtggcttcg ggccatcaaa 2760
 60 atgggaagat ctgaggaact ctcggaatc ggagctactc tggcgggaca ccagaagaaa 2820
 atcttggcca gtgtccagca catgaagtcc caggccaagc cgggaacccc ggttgggaca 2880
 ggaggaccgg ccccgagta ctga 2964

<210> 25
<211> 1041
5 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> ephrin-B1
10 <310> NM004429

<400> 25
atggctcggc ctgggcagcg ttggctcggc aagtggcttg tggcgatggt cgtgtgggcg 60
ctgtgccggc tcgccacacc gctggccaag aacctggagc ccgtatcctg gagctccctc 120
15 aacccaagt tcttgagtgg gaagggttg gtgatctatc cgaaaatttg agacaagctg 180
gacatcatct gcccccagc agaagcaggg cggccctatg agtactacaa gctgtacctg 240
gtgcggcctg agcaggcagc tgcctgtagc acagttctcg accccaacgt gttgggtcacc 300
tgcaataggc cagagcagga aatacgttt accatcaagt tccaggagt cagccccaac 360
20 tacatggggc tggagttcaa gaagcaccat gattactaca ttacctcaac atccaatgga 420
agcctggagg ggctggaaaa ccgggagggc ggtgtgtgcc gcacacgcac catgaagatc 480
atcatgaagg ttgggcaaga tcccaatgct gtgacgcctg agcagctgac taccagcagg 540
cccagcaagg aggcagacaa cactgtcaag atggccacac aggcccttg tagtcggggc 600
tccctgggtg actctgatgg caagcatgag actgtgaacc aggaagagaa gagggtggcca 660
ggtgcaagtg ggggcagcag cggggaccct gatggcttct tcaactccaa ggtggcattg 720
25 ttgcgcgctg tcggtgcccg ttgcgtcatc ttctgtctca tcatcatctt cctgacggtc 780
ctactactga agctacgcaa gcggcaccgc aagcacacac agcagcgggc ggtgcccctc 840
tcgctcagta ccctggccag tcccaagggg ggcaaggcca cagcgggcac cgagcccagc 900
gacatcatca ttcccttacg gactacagag aacaactact gcccacta tgagaagggtg 960
agtggggact acgggcaccc tgtctacatc gtccaagaga tgccgccccca gagcccggcg 1020
30 aacatctact acaaggctctg a
1041

<210> 26
<211> 1002
35 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>

<400> 26
atggctgtga gaagggactc cgtgtggaag tactgctggg gtgttttgat ggttttatgc 60
agaactgcga ttccaaatc gatagtttta gagcctatct attggaattc ctggaactcc 120
aaatttctac ctggacaagg actggtacta taccacaga taggagacaa attggatatt 180
45 atttgcocca aagtggactc taaaactgtt ggccagtatg aatattataa agtttatatg 240
gttgataaag accaagcaga cagatgcact attaagaagg aaaatacccc tctcctcaac 300
tgtgccaaac cagaccaaga tatcaaattc accatcaagt ttcaagaatt cagccctaac 360
ctctggggtc tagaatttca gaagaacaaa gattattaca ttatatctac atcaaatggg 420
tctttggagg gctgggataa ccaggaggga ggggtgtgcc agacaagagc catgaagatc 480
ctcatgaaag ttggacaaga tgcaagtctt ggaagaagtt cgacaacaag tccctttgta 540
50 agacgtccag aactagaagc tggtaacaaat ggaagaagtt cgacaacaag tccctttgta 600
aaaccaaattc caggttctag cacagacggc aacagcgccg gacattcggg gaacaacatc 660
ctcgggttccg aagtggcctt atttgagggt attgcttcag gatgcacat cttcatcgtc 720
atcatcatca cgtggtggt cctcttgctg aagtaccgga ggagacacag gaagcactcg 780
cgcagcaca cgaccagct gtcgctcagc acactggcca caccacagcg cagcggcaac 840
55 aacaacggct cgagcccag tgacattatc atcccgttaa ggactgcgga cagcgtcttc 900
tgccctcact acgagaaggc cagcggcgac tacgggcacc cgtgtgtacat cgtccaggag 960
atgccccgcg agagcccggc gaacatttac tacaaggctc ga
1002

<210> 27
<211> 1023
60 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

5  atggggcccc cccattctgg gccggggggc gtgcgagtcg gggccctgct gctgctgggg 60
   gttttggggc tgggtgtctgg gctcagcctg gagcctgtct actggaactc ggccaataag 120
   aggttccagg cagaggggtgg ttatgtgctg taccctcaga tcggggaccg gctagacctg 180
   ctctgccccg gggcccgccc tcttggccct cactcctctc ctaattatga gttctacaag 240
   ctgtacctgg taggggggtgc tcagggccgg cgctgtgagg caccctctgc cccaaacctc 300
   cttctcactt gtgatcgccc agacctggat ctccgcttca ccatcaagtt ccaggagtat 360
10 agccctaata tctggggcca cgagttccgc tcgcaccacg attactacat cattgccaca 420
   tcggatggga cccgggaggg cctggagagc ctgcagggag gtgtgtgcct aaccagaggc 480
   atgaaggtgc ttctccgagt gggacaaagt ccccgaggag gggctgtccc ccgaaaacct 540
   gtgtctgaaa tgcccatgga aagagaccga ggggcagccc acagcctgga gcctgggaag 600
   gagaacctgc caggtgacct caccagcaat gcaacctccc ggggtgtgta agggcccttg 660
15 cccctcccca gcatgcctgc agtggctggg gcagcagggg ggtgtgctgt gctcttgctg 720
   ggctgtggcg gggctggggg tgccatgtgt tggcggagac ggcgggcca gctctcgag 780
   agtcgccacc ctggtcctgg ctccctcggg aggggagggt ctctgggctt ggggggtgga 840
   ggtgggatgg gacctcggga ggctgagcct ggggagctag ggatagctct gcgggggtggc 900
   ggggctgcag atccccctt ctgccccac tatgagaagg tgagtgggtg ctatgggcat 960
20 cctgtgtata tcgtgcagga tgggcccccc cagagccctc caaacatcta ctacaaggtg 1020
   tga 1023

```

<210> 28

25 <211> 3399

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

30 <302> telomerase reverse transcriptase

<310> AF015950

<400> 28

```

35 atgcgcgcgc ctccccgctg ccgagccgtg cgctccctgc tgcgcagcca ctaccgcgag 60
   gtgtgcccgc tggccacgtt cgtgcggcgc ctggggcccc agggctggcg gctgggtgag 120
   cgcggggacc cggcggttt ccgcgcgctg gtggcccagt gcctgggtgt cgtgccctgg 180
   gacgcacggc cggccccgcg cggccccctc ttccgccagg tgtctgcct gaaggagctg 240
   gtggcccag tgtgcagag gctgtgcgag cgcggcgcca agaactgtgt ggccttcggc 300
   ttccgcgtgc tggacggggc ccgcgggggc cccccaggg ccttcaccac cagcgtgcgc 360
40 agctacctgc ccaacacggt gaccgacgca ctgcggggga gcggggcggt ggggctgctg 420
   ctgcgcgcgc tgggcgacga cgtgctgggt cacctgctgg cacgtgcgc gctctttgtg 480
   ctggtggctc ccagctgcgc ctaccaggtg tgcgggcgc cgctgtacca gctcggcgct 540
   gccactcagg cccggccccc gccacacgct agtggacccc gaaggcgtct gggatgcgaa 600
   cgggcctgga accatagcgt cagggaggcc ggggtcccc tgggcctgcc agccccgggt 660
45 gcgaggaggc gcgggggagc tgccagccga agtctgcctg tgcccaagag gccaggcgt 720
   ggcgctgccc ctgagccgga gcggacgccc gttgggcagg ggtcctgggc ccaccgggc 780
   aggacgcgtg gaccgagtga ccgtggtttc tgtgtggtgt cacctgccag acccgccgaa 840
   gaagccacct ctttgagggt tgcgtctctt ggcacgcgc actcccacc atccgtgggc 900
   cgccagcacc acgcggggcc cccatccaca tcgcggccac cacgtccctg ggacacgcct 960
50 tgtccccggg tgtacgcca gaccaacac ttccctact cctcaggcga caaggagcag 1020
   ctgcggccct ccttccctact cagctctctg aggcggagcc tgactggcgc tcggaggctc 1080
   gtggagacca tctttctggg ttccaggccc tggatgccag ggactcccc caggttgccc 1140
   cgcctgcccc agcgtactg gcaaatgcgg cccctgtttc tggagctgct tgggaaccac 1200
   gcgcagtgcc cctacggggt gctcctcaag acgcaactgcc cgctgcgagc tgcggtcacc 1260
55 ccagcagccg gtgtctgtgc ccgggagaag ccccagggtc ctgtggcggc ccccgaggag 1320
   gaggacacag acccccgtcg cctggtgcag ctgctccgcc agcacagcag cccctggcag 1380
   gtgtacggct tcgtgcgggc ctgctgcgc cggtggtgc ccccgagcct ctggggctcc 1440
   aggcacaacg aacgcgctt cctcaggaac accaagaagt tcactccct ggggaagcat 1500
   gccaagctct cgctgcagga gctgacgtgg aagatgagcg tgcgggactg cgcttggtg 1560
60 cgcaggagcc caggggttgg ctgtgttcgg gccgcagagc accgtctgcg tgaggagatc 1620
   ctggccaagt tcctgcact gtgatgagt tcgagctgct caggtcttcc 1680
   ttttatgtca cggagaccac gtttcaaaag aacaggctct tttctaccg gaagagtgtc 1740

```

5 tggagcaagt tgcaaagcat tggaaatcaga cagcacttga agaggggtgca gctgcggggag 1800
 ctgtcggaaag cagagggtcag gcagcatcgg gaagccaggc ccgccctgct gacgtccaga 1860
 ctccgcttca tccccaaaggc tgacgggctg cggccgattg tgaacatgga ctacgtcgtg 1920
 ggagccagaa cgttccgcag agaaaagagg gccgagcgtc tcacctcgag ggtgaaggca 1980
 ctgttcagcg tgctcaacta cgagcgggcg cggcgccccg gcctcctggg cgcctctgtg 2040
 ctgggacctg acgatatcca cagggcctgg cgcaccttcg tgctgcgtgt gcgggcccag 2100
 gacccgcccgc ctgagctgta ctttgtcaag gtggatgtga cgggcgcgta cgacaccatc 2160
 cccagggaca ggctcacgga ggtcatcgcc agcatcatca aaccccagaa cacgtactgc 2220
 10 agccacgtct ctaccttgac agacctccag ccgtacatgc gacagttcgt ggctcacctg 2340
 caggagacca gcccgctgag ggatgccgtc gtcacagagc agagctcctc cctgaatgag 2400
 gccagcagtg gcctcttcga cgtcttcccta cgttcatgt gccaccacgc cgtgcgcatac 2460
 aggggcaagt cctacgtcca gtgccagggg atcccgagg gctccatcct ctccacgctg 2520
 ctctgcagcc tgtgtacagg cgacatggag aacaagctgt ttgcggggat tcggcgggac 2580
 15 gggctgctcc tgcggttggg ggatgatttc ttgttgggtga cacctcacct caccacgcg 2640
 aaaaccttcc tcaggaccct ggtccgagggt gtccctgagt atggctgctg ggtgaacttg 2700
 cggaagacag tgggtgaactt ccctgtagaa gacgaggccc tgggtggcac ggcttttgtt 2760
 cagatgccgg cccacggcct attccctgg tgccgctgc tgctggatac ccggaccctg 2820
 gaggtgcaga gcgactactc cagctatgcc cggacctcca tcagagccag tctcaccttc 2880
 20 aaccgcggtc tcaaggctgg gaggaacatg cgtcgcaaac tctttggggt cttgcggctg 2940
 aagtgtcaca gcctgtttct ggatttgcag gtgaacagcc tccagacggt gtgcaccaac 3000
 atctacaaga tctcctgct gcaggcgtag aggtttcacg catgtgtgct gcagctccca 3060
 tttcatcagc aagtttggaa gaacccccaca ttttctctgc gcgtcatctc tgacacggcc 3120
 25 tccctctgct actccatcct gaaagccaag aacgcaggga tgtcgctggg ggccaagggc 3180
 gccgcccggc ctctgccctc cgaggccgtg cagtggctgt gccaccaagc attcctgtct 3240
 aagctgactc gacaccgtgt cacctacgtg ccactcctgg ggtcactcag gacagcccag 3300
 acgcagctga gtcggaagct cccggggacg acgctgactg ccctggaggc cgcagccaac 3360
 ccggcactgc cctcagactt caagaccatc ctggactga 3399

30 <210> 29
 <211> 567
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <300>
 <302> K-ras
 <310> M54968

40 <400> 29
 atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gcttgtggcg taggcaagag tgccttgacg 60
 atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgata caacaataga ggattcctac 120
 aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcagg 180
 45 caagaggagt acagtgcaat gaggggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
 gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatatcc accattatag agaacaaatt 300
 aaaaagagtta aggactctga agatgtacct atggctcctag taggaaataa atgtgatttg 360
 ctttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tgggaattcct 420
 tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt 480
 cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaaaga gaaaaagaag 540
 50 tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa 567

<210> 30
 <211> 3840
 55 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> mdr-1
 60 <310> AF016535

<400> 30

	atggatcttg	aaggggaccg	caatggagga	gcaaagaaga	agaacttttt	taaactgaac	60
	aataaaagt	aaaaagataa	gaaggaaaag	aaaccaactg	tcagtgtatt	ttcaatgttt	120
	cgctattcaa	attggcttga	caagttgtat	atgggtggg	gaactttggc	tgccatcatc	180
5	catggggctg	gacttcctct	catgatgctg	gtgtttggag	aaatgacaga	tatctttgca	240
	aatgcaggaa	atttagaaga	tctgatgtca	aacatcacta	atagaagtga	tatcaatgat	300
	acagggttct	tcatgaatct	ggaggaagac	atgaccaggt	atgcctatta	ttacagtggg	360
	attgggtgctg	gggtgctggg	tgctgcttac	attcagggtt	cattttgggtg	cctggcagct	420
	ggaagacaaa	tacacaaaat	tagaaaacag	ttttttcatg	ctataatgcg	acaggagata	480
10	ggctggtttg	atgtgcacga	tggtggggag	cttaacaccc	gacttacaga	tgatgtctcc	540
	aagattaatg	aaggaattgg	tgacaaaatt	ggaatgttct	ttcagtcaat	ggcaacattt	600
	ttcactgggt	ttatagtagg	atttacacgt	ggttgggaagc	taacccttgt	gattttggcc	660
	atcagtcctg	ttcttggact	gtcagctgtc	gtctgggcaa	agatactatc	ttcatttact	720
	gataaagaac	tcttagcgta	tgcaaaagct	ggagcagtag	ctgaagaggt	cctggcagca	780
	attagaactg	tgattgcatt	tgaggagcaa	aagaaagaac	ttgaaaggta	caacaaaaat	840
15	ttagaagaag	ctaaaagaat	tggtataaag	aaagctatta	cagccaatat	ttctataggt	900
	gctgctttcc	tgctgatcta	tgcatcttat	gctctggcct	tctggtatgg	gaccaccttg	960
	gtcctctcag	gggaatatcc	tattggacaa	gtactcactg	tattttctgt	attaattggg	1020
	gctttttagt	ttggacaggc	atctccaagc	attggaagcat	ttgcaaagtc	aagaggagca	1080
20	gcttatgaaa	tcttcaagat	aattgataat	aagccaagta	ttgacagcta	ttcgaagagt	1140
	gggcacaaac	cagataatat	taagggaat	ttggaattca	gaaatgttca	cttcagttac	1200
	ccatctcgaa	aagaagttaa	gatcttgaag	ggtctgaacc	tgaagggtgca	gagtgggcag	1260
	acggtggccc	tggttggaaa	cagtggctgt	gggaagagca	caacagtcca	gctgatgcag	1320
	aggctctatg	acccacaga	ggggatggtc	agtgttgatg	gacaggatat	taggaccata	1380
	aatgtaaagt	ttctacggga	aatcattggg	gtggtgagtc	aggaacctgt	attgtttgcc	1440
25	accacgatag	ctgaaaacat	tcgctatggc	cgtgaaaatg	tcaccatgga	tgagattgag	1500
	aaagctgtca	aggaagccaa	tcgctatgac	tttatcatga	aactgcctca	taaatttgac	1560
	accttggttg	gagagagagg	ggcccagttg	agtgggtgggc	agaagcagag	gatcgccatt	1620
	gcacgtgccc	tggttcgcaa	ccccagatc	ctcctgctgg	atgaggccac	gtcagccttg	1680
30	gacacagaaa	gcgaagcagt	gggtcagggt	gctctggata	aggccagaaa	aggtcggacc	1740
	accattgtga	tagctcatcg	tttgtctaca	gttcgtaatg	ctgacgtcat	cgctggtttc	1800
	gatgatggag	tcattgtgga	gaaaggaaat	catgatgaac	tcatgaaaga	gaaaggcatt	1860
	tacttcaaac	ttgtcacaaat	gcagacagca	ggaatgaag	ttgaattaga	aatgacagct	1920
	gatgaatcca	aaagtgaat	tgatgccttg	gaaatgtctt	caaatgattc	aagatccagt	1980
35	ctaataagaa	aaagatcaac	tcgtaggagt	gtccgtggat	cacaagcccc	agacagaaa	2040
	cttagtacca	aagaggctct	ggatgaaagt	atacctccag	tttccctttg	gaggattatg	2100
	aagctaaatt	taactgaatg	gccttatttt	gttgttgggtg	tattttgtgc	cattataaat	2160
	ggaggcctgc	aaccagcatt	tgcaataata	ttttcaaaga	ttataggggt	ttttacaaga	2220
	attgatgatc	ctgaaacaaa	acgacagaat	agtaacttgt	tttactatt	gtttctagcc	2280
40	cttggaaatta	tttcttttat	tacatttttc	cttcagggtt	tcacatttgg	caaagctgga	2340
	gagatcctca	ccaagcgct	ccgatacatg	gttttccgat	ccatgtctcag	acaggattgt	2400
	agttgggttg	atgaccttaa	aaacaccact	ggagcattga	ctaccaggct	cgccaatgat	2460
	gctgctcaag	ttaaaggggc	tataggttcc	aggcttgcgt	taattaccca	gaatatagca	2520
	aatcttggga	caggaataat	tatatccttc	atctatgggt	ggcaactaac	actgttactc	2580
	ttagcaattg	tacctatcat	tgcaatagca	ggagttgttg	aaatgaaaat	gttgtctgga	2640
45	caagcactga	aaagataaga	agaactagaa	ggtgctggga	agatcgctac	tgaagcaata	2700
	gaaaacttcc	gaaccgttgt	ttctttgact	caggagcaga	agtttgaaca	tatgtatgct	2760
	cagagtttgc	aggtaccata	cagaaactct	ttgaggaaag	cacacatctt	tggaattaca	2820
	ttttccttca	cccaggcaat	gatgtatttt	tcctatgctg	gatgtttccg	gtttggagcc	2880
	tacttggttg	cacataaact	catgagcttt	gaggatgttc	tgtagtatt	ttcagctgtt	2940
50	gtctttgggt	ccatggccgt	ggggcaagtc	agttcatttg	ctcctgacta	tgccaaagcc	3000
	aaaatatcag	cagccacat	catcatgatc	attgaaaaaa	cccctttgat	tgacagctac	3060
	agcacggaag	gcctaattgc	gaacacattg	gaaggaaatg	tcacatttgg	tgaagttgta	3120
	ttcaactatc	ccaccgacc	ggacatccca	gtgcttcagg	gactgagcct	ggaggtgaag	3180
	aagggccaga	cgctggctct	gggtgggcagc	agtggctgtg	ggaagagcac	agtgggtccag	3240
55	ctcctggagc	ggttctacga	ccccttggca	gggaaagtgc	tgcttgatgg	caaagaaata	3300
	aagcgactga	atgttcagt	gctccgagca	cacctgggca	tcgtgtccca	ggagcccac	3360
	ctgtttgact	gcagcattgc	tgagaacatt	gcttatggag	acaacagccg	gggtgggtc	3420
	caggaagaga	ttgtgagggc	agcaaaggag	gccaacatac	atgccttcat	cgagtcactg	3480
	cctaataaat	atagcactaa	agtaggagac	aaagggaactc	agctctctgg	tggccagaaa	3540
60	caacgcattg	ccatagctcg	tgcccttgtt	agacagcctc	atattttgct	tttggatgaa	3600
	gccacgtcag	ctctggatac	agaaagtga	aaggttgttc	aagaagccct	ggacaaagcc	3660
	agagaaggcc	gcacctgcat	tgtgattgct	caccgcctgt	ccaccatcca	gaatgcagac	3720

ttaatagtggtg tggttcagaa tggcagagtc aaggagcatg gcacgcatca gcagctgctg 3780
 gcacagaaaag gcatctatctt ttcaatggtc agtgtccagg ctggaacaaa gcgcagtgta 3840

5 <210> 31
 <211> 1318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <302> UPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor)
 <310> XM009232

<400> 31

15 atgggtcacc cgccgctgct gccgctgctg ctgctgctcc acacctgctg cccagcctct 60
 tggggcctgc ggtgcatgca gtgtaagacc aacggggatt gccgtgtgga agagtgcgcc 120
 ctgggacagg acctctgcag gaccacgatc gtgcgcttgt gggaagaagg agaagagctg 180
 gagctgggtg agaaaagctg taccactca gagaagacca acaggaccct gagctatcgg 240
 actggcttga agatcaccag ccttaccgag gttgtgtgtg ggtagactt gtgcaaccag 300
 20 ggcaactctg gccgggctgt cacctattcc cgaagccgtt acctcgaatg catttcctgt 360
 ggctcatcag acatgagctg tgagaggggc cggcaccaga gcctgcagtg ccgcagccct 420
 gaagaacagt gcctggatgt ggtgaccac tggatccagg aaggtgaaga agggcgctca 480
 aaggatgacc gccacctccg tggctgtggt taccttcccg gctgccgggg ctccaatggt 540
 ttccacaaca acgacacctt ccacttcctg aaatgctgca acaccacaa atgcaacgag 600
 25 ggcccaatcc tggagcttga aaatctgccg cagaatggcc gccagtgtta cagctgcaag 660
 gggaacagca cccatggatg ctctctgaa gagactttcc tcattgactg ccgaggcccc 720
 atgaatcaat gtctggtagc caccggcact cacgaaccga aaaaccaaaag ctatatggta 780
 agaggctgtg caaccgcctc aatgtgccaa catgcccacc tgggtgacgc cttcagcatg 840
 aaccacattg atgtctcctg ctgtactaaa agtggctgta accaccaga cctggatgct 900
 30 cagtaccgca gtggggctgc tctcagcct ggccctgccc atctcagcct caccatcacc 960
 ctgctaataga ctgccagact gtggggaggc actctctctt ggacctaaac ctgaaatccc 1020
 cctctctgcc ctggctggat ccgggggacc cctttgccct tccctcggct cccagcccta 1080
 cagacttgct gtgtgacctc aggccagtggt gccgacctct ctgggcctca gttttcccag 1140
 ctatgaaaac agctatctca caaagttgtg tgaagcagaa gagaaaagct ggaggaaggc 1200
 35 cgtggggccaa tgggagagct cttgttatta ttaatatgtg tgccgctggt gtgttggtgt 1260
 tattaattaa tattcatatt atttatttta tacttacata aagattttgt accagtgg 1318

<210> 32
 40 <211> 636
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 45 <302> Bak
 <310> U16811

<400> 32

50 atggcttcgg ggcaaggccc aggtcctccc aggcaggagt gcggagagcc tgccctgccc 60
 tctgcttctg aggagcaggt agcccaggac acagaggagg ttttccgcag ctacgttttt 120
 taccgccatc agcaggaaca ggaggctgaa ggggtggctg ccctgcccga cccagagatg 180
 gtcaccttac ctctgcaacc tagcagcacc atggggcagg tgggacggca gctcgccatc 240
 atcggggacg acatcaaccg acgctatgac tcagagttcc agaccatggt gcagcacctg 300
 cagcccacgg cagagaatgc ctatgagtac ttcaccaaga ttgccaccag cctgtttgag 360
 55 agtggcatca attggggccg tgtggtggct cttctgggct tcggctaccg tctggcccta 420
 cactctacc agcatggcct gactggcttc ctaggccagg tgaccgctt cgtggctgac 480
 ttcatgctgc atcactgcat tgcccggctg attgcacaga ggggtggctg ggtggcagcc 540
 ctgaacttgg gcaatggtcc catcctgaac gtgctggtgg ttctgggtgt ggttctgttg 600
 60 ggccagtttg tggtagaag attcttcaaa tcatga 636

<210> 33

<211> 579
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <300>
 <302> Bax alpha
 <310> L22473

<400> 33
 10 atggacgggt ccgggggagca gcccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
 aagacagggg cccttttgct tcagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120
 gaggcacccg agctggccct ggaccgggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180
 gagtgtctca agcgcacgag ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
 gccgccgtgg acacagactc cccccgagag gtctttttcc gaggggcagc tgacatgttt 300
 15 tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcgccctt tctactttgc cagcaaactg 360
 gtgctcaagg ccctgtgcac caagggtgcc gaactgatca gaaccatcat gggctggaca 420
 ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accaggggtg ttgggacggc 480
 ctctctctct actttgggac gcccacgtgg cagaccgtga ccatctttgt ggcgggagtg 540
 ctcaccgcct cgctcaccat ctggaagaag atgggctga 579

20
 <210> 34
 <211> 657
 <212> DNA
 25 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> Bax beta
 <310> L22474

30 <400> 34
 atggacgggt ccgggggagca gcccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
 aagacagggg cccttttgct tcagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120
 gaggcacccg agctggccct ggaccgggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180
 35 gagtgtctca agcgcacgag ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
 gccgccgtgg acacagactc cccccgagag gtctttttcc gaggggcagc tgacatgttt 300
 tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcgccctt tctactttgc cagcaaactg 360
 gtgctcaagg ccctgtgcac caagggtgcc gaactgatca gaaccatcat gggctggaca 420
 ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accaggggtg ttgggtgaga 480
 40 ctctctcaagc ctctcaccg ccaccaccgc gccctcacca ccgccctgc cccaccgtcc 540
 ctgccccccg ccaactcctt gggaccctgg gccttctgga gcaggtcaca gtggtgccct 600
 ctccccatct tcagatcatc agatgtggtc tataatgcgt tttccttacg tgtctga 657

45 <210> 35
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <300>
 <302> Bax delta
 <310> U19599

<400> 35
 55 atggacgggt ccgggggagca gcccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
 aagacagggg cccttttgct tcagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120
 gaggtctttt tccgagtggc agctgacatg ttttctgacg gcaacttcaa ctggggcccg 180
 gttgtcgccc ttttctactt tgccagcaaa ctggtgctca aggccctgtg caccaagggtg 240
 ccggaactga tcagaaccat catgggctgg acattggact tcctccggga gcggctgttg 300
 60 ggctggatcc aagaccaggg tggttgggac ggcctcctct cctactttgg gacgcccacg 360
 tggcagaccg tgaccatctt tgtggcggga gtgctcaccg cctcgctcac catctggaag 420
 aagatgggct ga 432

5 <210> 36
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> Bax epsolin
 10 <310> AF007826

 <400> 36
 atggacgggt ccggggagca gcccagaggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
 15 aagacagggg cccttttgct tcagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120
 gaggcacccg agctggccct ggacccgggt cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180
 gagtgtctca agcgcctcgg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
 gccgccgtgg acacagactc cccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300
 tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtcgcccttt tctactttgc cagcaaaactg 360
 gtgctcaagg ctggcgtgaa atggcgtgat ctgggctcac tgcaacctct gcctcctggg 420
 20 ttcaagcgat tcacctgcct cagcatccca aggagctggg attacaggcc ctgtgcacca 480
 aggtgccgga actga 495

 <210> 37
 25 <211> 582
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> bcl-w
 30 <310> U59747

 <400> 37
 atggcgaccc cagcctcggc cccagacaca cgggctctgg tggcagactt tgtaggttat 60
 35 aagctgaggg agaaggggta tgtctgtgga gctggcccg gggagggccc agcagctgac 120
 ccgctgcacc aagccatgag ggcagctgga gatgagttcg agaccgctt ccggcgaccc 180
 ttctctgatc tggcggctca gctgcatgtg accccaggct cagcccagca acgcttcacc 240
 caggtctccg acgaactttt tcaagggggc cccaactggg gccgccttgt agccttcttt 300
 gtctttgggg ctgcaactgtg tgctgagagt gtcaacaagg agatggaacc actggtggga 360
 40 caagtgcagg agtggatggg ggcctacctg gagacgcggc tggctgactg gatccacagc 420
 agtgggggct gggcggagtt cacagctcta tacggggacg gggccctgga ggaggcgcgg 480
 cgtctgcggg aggggaactg ggcctcagtg aggacagtgc tgacgggggc cgtggcactg 540
 ggggccctgg taactgtagg ggcctttttt gctagcaagt ga 582

 45 <210> 38
 <211> 2481
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> HIF-alpha
 50 <310> U22431

 <400> 38
 atggagggcg ccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
 aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
 gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcata ttgataaggc ctctgtgatg 180
 aggcttacca tcagctatct gcgtgtgagg aaacttcttg atgctgggtga tttggatatt 240
 60 gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300
 atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataattgtga caaatatag 360
 ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420

catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480
 caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgtt ccctaactag ccgaggaaga 540
 actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
 tatgatacca acagtaacca acctcagtggt ggggtataaga aaccacctat gacctgcttg 660
 5 gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccat tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720
 actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
 gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
 gctttggact ctgatcatct gaccaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
 accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agagggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
 10 gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
 gttgtgagtgt gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaaac agaattgtgc 1080
 cttaaaccgg ttgaattctt agatagttaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
 gaagatacaa gtgacctctt tgacaaactt aagaaggaaac ctgatgcttt aactttgctg 1200
 gccccagccg ctggagacac aatcatatct ttagattttg gcagcaacga cacagaaact 1260
 15 gatgaccagc aacttgagga agtaccatta tataatgatg taatgctccc ctcaccaaac 1320
 gaaaaattac agaataaaa tttggcaatg tctccattac ccaccgctga aacgccaaaag 1380
 ccacttcgaa gtagtgtga cctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca 1440
 aatccagagt cactggaact ttcttttacc atgccccaga ttcaggatca gacacctagt 1500
 ccttccgatg gaagcactag acaaagtcca cctgagccta atagtcccag tgaattattgt 1560
 20 ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagtgg aattggtaga aaaacttttt 1620
 gctgaagaca cagaagcaaa gaacccattt tctactcagg acacagattt agacttggag 1680
 atgttagctc cctatatccc aatggatgat gacttccagt tacgttccct cgatcagttg 1740
 tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagcgcaa gtcctcaaag cacagttaca 1800
 gtattccagc agactcaaat acaagaacct actgctaatt ccaccactac cactgccacc 1860
 25 actgatgaat taaaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca 1920
 tctccatctc ctacccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga 1980
 gatactcaaa gtcggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcac agaacagaca 2040
 gaaaaatctc atccaagaag ccctaacgtg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca 2100
 30 gttcctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaattgctca gagaaagcga 2160
 aaaatggaac atgatggttc actttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag 2220
 ccagacgata atgcagctac tacatcactt tcttggaaac gtgtaaaagg atgcaaactc 2280
 agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attattttta taccctctga ttttagcatgt 2340
 -agactgctgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt 2400
 35 gaagttaatg ctctataca aggcagcaga aacctactgc aggggtgaaga attactcaga 2460
 gctttggatc aagttaactg a 2481

<210> 39

<211> 481

40 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

<302> ID1

45 <310> X77956

<400> 39

atgaaagtgc ccagtggcag caccgccacc gccgcgcggt gccccagctg cgcgctgaag 60
 gccggcaaga cagcgagcgg tgcgggagcgt gtgggtgcgt gtctgtctga gcagagcgtg 120
 50 gccatctcgc gctgccgggg cgccggggcg cgctgacctg cctgctgga cgagcagca 180
 gtaaacgtgc tgctctacga catgaacggc tgttactcac gcctcaagga gctgggtgcc 240
 acctgcccc agaaccgcaa ggtgagcaag gtggagattc tccagcacgt catcgactac 300
 atcaggggacc ttcagtggga gctgaactcg gaatccgaag ttgggacccc cggggggccga 360
 55 gggctgcccg tccgggctcc gctcagcacc ctcaacggcg agatcagcgc cctgacggcc 420
 gaggcggcat gcgttcctgc ggacgatcgc atcttgtgtc gctgaatggt gaaaaaaaaa 480
 a 481

<210> 40

<211> 110

60 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>
<302> ID2B
<310> M96843

5

<400> 40
tgaaagcctt cagtcccgtg aggtccatta ggaaaaacag cctgttggac caccgcctgg 60
gcatctccca gagcaaaacc ccggtggatg acctgatgag cctgctgtaa 110

10

<210> 41
<211> 486
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15

<300>
<302> ID4
<310> Y07958

20

<400> 41
atgaaggcgg tgagcccggg gcgcccctcg ggccgcaagg cgcgcgcggg ctgcggcggc 60
ggggagctgg cgctgcgctg cctggccgag cacggccaca gcctgggtgg ctccgcagcc 120
gcggcggcgg cggcggcggc agcgcgctgt aaggcggcgg aggcggcggc cgacgagccg 180
gcgctgtgcc tgcagtgcga tatgaacgac tgctatagcc gcctgcggag gctgggtgcc 240
25 accatccccg ccaacaagaa agtcagcaaa gtggagatcc tgcagcacgt tatcgactac 300
atcctggacc tgcagctggc gctggagacg caccggggcc tgctgaggca gccaccaccg 360
cccgcgccgc cacaccaccc ggccgggacc tgtccagccg cgcgcgcgcg gaccccgctc 420
actgcgctca acaccgaccc ggccggcgcg gtgaacaagc agggcgacag cattctgtgc 480
cgctga 486

30

<210> 42
<211> 462
<212> DNA
<213> Homo sapiens

35

<300>
<302> IGF1
<310> NM000618

40

<400> 42
atgggaaaaa tcagcagtct tccaacccaa ttatttaagt gctgcttttg tgatttcttg 60
aagggtgaaga tgcacaccat gtccctctcg catctcttct acctggcgct gtgcctgtct 120
accctcacca gctctgccac ggctggaccg gagacgctct gcggggctga gctgggtggat 180
45 gctcttcagt tcgtgtgtgg agacaggggc ttttatttca acaagcccac agggatatggc 240
tccagcagtc ggagggcgcc tcagacaggc atcgtggatg agtgcctgct ccggagctgt 300
gatctaagga ggctggagat gtattgcgca cccctcaagc ctgccaaagtc agctcgctct 360
gtccgtgccc agcgccacac cgacatgccc aagacccaga aggaagtaca tttgaagaac 420
50 gcaagtagag ggagtgcagg aaacaagaac tacaggatgt ag 462

<210> 43
<211> 591
<212> DNA
<213> Homo sapiens

55

<300>
<302> PDGFA
<310> NM002607

60

<400> 43
atgaggacct tggcttgctt gctgctcctc ggctgcggat acctcgccca tgttctggcc 60

29/95

gaggaagccg agatcccccg cgaggtgacg gagaggtcgg cccgcagtcg gatccacagc 120
 atccggggacc tccagcgact cctggagata gactccgtag ggagtgagga ttctttggac 180
 accagcctga gagtcacagg ggtccacgcc actaagcatg tgcccagaga ggcggccctg 240
 cccatttcga ggaagagaag catcgaggaa gctgtccccc ctgtctgcaa gaccaggacg 300
 5 gtcatcttac agattcctcg gagtcaggtc gacccacagt ccgccaactt cctgatctgg 360
 ccccgctgag tggaggtgaa acgctgcacc ggctgctgca acacgagcag tgtcaagtgc 420
 cagccctccc gcgtccacca ccgcagcgctc aaggtggcca aggtggaata cgtcaggaag 480
 aagccaaaat taaaagaagt ccaggtgagg ttagaggagc atttgagtg cgcctgcgcg 540
 10 accacaagcc tgaatccgga ttatcgggaa gaggacacgg atgtgaggtg a 591

<210> 44
 <211> 528
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> PDGFRA
 <310> XM003568

20 <400> 44
 atggccaagc ctgaccacgc taccagtga gttctacgaga tcatggtgaa atgctggaac 60
 agtgagccgg agaagagacc ctctttttac cacctgagtg agattgtgga gaatctgctg 120
 cctggacaat ataaaaagag ttatgaaaaa attcacctgg acttcctgaa gagtaccat 180
 25 cctgctgtgg cagcgcagcg tgtggactca gacaatgcat acattggtgt cacctacaaa 240
 aacgaggaag acaagctgaa ggactgggag ggtggtctgg atgagcagag actgagcgct 300
 gacagtggct acatcattcc tctgcctgac attgacctg tccctgagga ggaggacctg 360
 ggcaagagga acagacacag ctgcagacc tctgaagaga gtgccattga gacgggttcc 420
 agcagttcca cttcatcaa gagagaggac gagaccattg aagacatga catgatggat 480
 30 gacatcggca tagactcttc agacctgggt gaagacagct tcctgtaa 528

<210> 45
 <211> 1911
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> PDGFRB
 40 <310> XM003790

<400> 45
 atggcgcttc cgggtgagat gccagctctg gccctcaaag gcgagctgct gttgctgtct 60
 ctctgtttac ttctggaaac acagatctct cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca 120
 45 gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg 180
 gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccc caggaaatgg ccaaggccca ggatggcacc 240
 ttctccagcg tctcacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
 acccacaatg actcccgctg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catctttgtg 360
 ccagatccca ccgtgggctt cctcccta at gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 420
 50 gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtacacagacc atcaccaacg tggcttttct 540
 cagcagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggcttttct 540
 ggtatctttg aggcagaga ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
 tctgatgcct actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
 gtgcagactg tggctcgcca gggtgagaac atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat 720
 55 gaggtgggtc acttcgagtg gacatacccc cgcaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 780
 gtgactgact tcctcttgga tatgccttac cacatccgct ccattcctgca catccccagt 840
 gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcaatgtga cggagagtgt gaatgaccat 900
 caggatgaaa aggccataaa catcacctgt gttgagagcg gctacgtgag gctcctggga 960
 gaggtgggca cactacaatt tgctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc 1020
 60 gagccctacc caccgcccac tgtcctgtgg ttcaaagaca accgcacctc gggcgactcc 1080
 agcgtggtgg aaatcgccct gtccacgcg aacgtgtcgg agaccgggta tgtgtcagag 1140
 ctgacactgg ttccgctgaa ggtggcagag gctggccact acaccatgag ggccttccat 1200

5 gaggatgctg aggtccagct ctccttccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgctg 1260
 gagctaagtg agagccaccc tgacagtggg gaacagacag tccgctgtcg tggccggggc 1320
 atgccccagc cgaacatcat ctggtctgcc tgcagagacc tcaaaagggtg tccacgtgag 1380
 ctgccgccca cgtgctggg gaacagttcc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg 1440
 acgtactggg aggaggagca ggagtttgag gtggtagaca cactgcgtct gcagcacgtg 1500
 gatcgccac tgtcgggtgc ctgcacgctg cgcaacgctg tgggccagga cacgcaggag 1560
 gtcacgtgg tgccacactc cttgcccttt aagggtgggtg tgatctcagc catcctggcc 1620
 ctgggtgggtc tcaccatcat ctcccttatc atcctcatca tgctttggca gaagaagcca 1680
 cgttacgaga tccgatggaa ggtgattgag tctgtgagct ctgacggcca tgagtacatc 1740
 10 tacgtggacc ccattgcagc gccctatgac tccacgtggg agctgccgcg ggaccagctt 1800
 gtgctgggac gcaccctcgg ctctggggcc tttgggcagg tggtagggc cacggttcat 1860
 ggcctgagcc attttcaagc cccaatgaaa gtggccgtca aaaatgctta a 1911

15 <210> 46
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <300>
 <302> TGFbeta1
 <310> NM000660

25 <400> 46
 atgccgcct cccggctgct gctgctgccc ctgctgctac cgctgctgtg gctactgggtg 60
 ctgacgcctg gcccgccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg 120
 gtgaagcgga agcgcatcga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc 180
 agcccccgga gccaggggga ggtgccgccc ggcccgtgc ccgaggccgt gctcgccctg 240
 30 tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag 300
 gccgactact acgccaagga ggtcaccgcc gtgctaattg tggaaaccca caacgaaatc 360
 tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc 420
 cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggagg 480
 ctcaagttaa aagtggagca gcacgtggag ctgtaccaga aatacagcaa caattcctgg 540
 cgatacctca gcaaccggct gctggcacc agcgactcgc cagagtgggtt atcttttgat 600
 35 gtcaccggag ttgtgcggca gtggttgagc cgtggagggg aaattgaggg ctttcgcctt 660
 agcgccact gctcctgtga cagcagggat aacacactgc aagtggacat caacgggttc 720
 actaccggcc gccaggtga cctggccacc attcatggca tgaaccggcc tttcctgctt 780
 ctcatggcca ccccgctgga gagggccccc catctgcaaa gctcccggca ccgccagacc 840
 ctggacacca actattgctt cagctccacg gagaagaact gctgcgtgcg gcagctgtac 900
 40 attgacttcc gcaaggacct cggctggaag tggatccacg agcccaaggg ctaccatgcc 960
 aactttctgc tcgggcccctg cccctacatt tggagcctgg acacgcagta cagcaaggct 1020
 ctggccctgt acaaccagca taaccggggc gcctcgccgg cgccgtgctg cgtgccgcag 1080
 gcgctggagc cgctgcccat cgtgtactac gtgggcccga agcccaaggg ggagcagctg 1140
 45 tccaacatga tcgtgcgctc ctgcaagtgc agctga 1176

<210> 47
 <211> 1245
 <212> DNA
 50 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> TGFbeta2
 <310> NM003238

55 <400> 47
 atgcactact gtgtgctgag cgcttttctg atcctgcata tggtcacggc cgcgctcagc 60
 ctgtctacct gcagcacact cgatatggac cagttcatgc gcaagaggat cgaggcgatc 120
 cgcgggcaga tcctgagcaa gctgaagctc accagtcccc cagaagacta tcctgagccc 180
 60 gaggaagtcc ccccgagggt gatttccatc tacaacagca ccagggactt gctccaggag 240
 aaggcgagcc ggagggcggc cgcctgcgag gcgcgagagga gcgacgaaga gtactacgcc 300
 aaggagggtt acaaaataga catgccgccc ttcttcccct ccgaaaatgc catcccgcgc 360

5 actttctaca gaccctactt cagaattggt cgatttgacg tctcagcaat ggagaagaat 420
 gcttccaatt tgggtgaaagc agagttcaga gtctttcggt tgcagaaccc aaaagccaga 480
 gtgcctgaac aacggattga gctatatcag attctcaagt ccaaagattt aacatctcca 540
 acccagcgct acatcgacag caaagttgtg aaaacaagag cagaaggcga atggctctcc 600
 10 ttcgatgtaa ctgatgctgt tcatgaatgg cttcaccata aagacaggaa cctgggattt 660
 aaaataagct tacactgtcc ctgctgcact tttgtaccat ctaataatta catcatcca 720
 aataaaagtg aagaactaga agcaagattt gcagggtattg atggcacctc cacatatacc 780
 agtgggtgatc agaaaactat aaagtccact agggaaaaaa acagtgggaa gacccacat 840
 ctcttgctaa tgttattgcc ctctacaga cttgagtcac aacagaccaa cgggcggaag 900
 15 aagcgtgctt tggatgcggc ctattgcttt agaaatgtgc aggataattg ctgcctacgt 960
 ccactttaca ttgatttcaa gagggatcta ggggtggaat ggatacacga acccaaagg 1020
 tacaatgcc aacttctgtgc tggagcatgc ccgtatttat ggagttcaga cactcagcac 1080
 agcaggggtcc tgagcttata taataccata aatccagaag catctgcttc tcttctgtgc 1140
 gtgtcccaag atttagaacc tctaaccatt ctctactaca ttggcaaac acccaagatt 1200
 20 gaacagcttt ctaatatgat tgtaaagtct tgcaaatgca gctaa 1245

<210> 48

<211> 1239

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

<302> TGFbeta3

25 <310> XM007417

<400> 48

30 atgaagatgc acttgcaaag ggctctgggt gtccctggccc tgctgaactt tgccacggtc 60
 agcctctctc tgtccacttg caccaccttg gacttcggcc acatcaagaa gaagagggtg 120
 gaagccatta ggggacagat cttgagcaag ctcagggtca ccagccccc tgagccaacg 180
 gtgatgaccc acgtccccta tcagggtctg gccctttaca acagcaccgg ggagctgctg 240
 gagggatgc atggggagag ggaggaaggc tgcacccagg aaaacaccga gtcggaatac 300
 tatgccaaag aaatccataa attcgacatg atccaggggc tggcggagca caacgaactg 360
 35 gctgtctgcc ctaaagggaat tacctccaag gttttccgct tcaatgtgtc ctcatgtggag 420
 aaaaatagaa ccaacctatt ccgagcagaa ttccgggtct tgccgggtgcc caaccccgagc 480
 tctaagcggga atgagcagag gatcgagctc ttccagatcc ttccggccaga tgagcacatt 540
 gccaaacagc gctatatcgg tggcaagaat ctgcccacac ggggcactgc cgagtggctg 600
 tcctttgatg tctactgacac tgtgcgtgag tggctgttga gaagagagtc caacttaggt 660
 40 ctagaaatca gcattcactg tccatgtcac accttcagc ccaatggaga tatcctggaa 720
 aacattcacg aggtgatgga aatcaaattc aaaggcgtgg acaatgagga tgaccatggc 780
 cgtggagatc tggggcgccct caagaagcag aaggatcacc acaaccctca tctaactctc 840
 atgatgatcc cccacacccg gctcgacaac ccgggcccagg ggggtcagag gaagaagcgg 900
 gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc 960
 45 tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 1020
 gccaaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaaac ccacagcacg 1080
 gtgctgggac tgtacaacac tctgaacctt gaagcatctg cctcgccctg ctgcgtgccc 1140
 caggacctgg agcccttgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 1200
 50 ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagctga 1239

<210> 49

<211> 1704

<212> DNA

55 <213> Homo sapiens

<300>

<302> TGFbetaR2

<310> XM003094

60 <400> 49

atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg ccgctgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc 60
 gccagcacga tcccaccgca cgttcagaag tcggttaata acgacatgat agtcactgac 120

	atgcgaccct	ccgggacggc	cggggcagcg	ctcctggcgc	tgctggctgc	gctctgcccg	60
	gcgagtcggg	ctctggagga	aaagaaagtt	tgccaaggca	cgagtaacaa	gctcacgcag	120
	ttgggcactt	ttgaagatca	ttttctcagc	ctccagagga	tgttcaataa	ctgtgagggtg	180
	gtccttgagg	at ttggaaat	tacctatgtg	cagaggaatt	atgatctttc	cttcttaaaag	240
5	accatccagg	agggtgctgg	ttatgtcctc	attgccctca	acacagtggg	gcgaattcct	300
	ttggaaaacc	tgcatatcat	cagaggaaat	atgtactacg	aaaattccta	tgcccttagca	360
	gtcttatcta	actatgatgc	aaataaaaacc	ggactgaagg	agctgcccac	gagaaattta	420
	caggaaatcc	tgcatggcgc	cgtgcgggtc	agcaacaacc	ctgccctgtg	caacgtggag	480
	agcatccagt	ggcgggacat	agtcagcagt	gactttctca	gcaacatgtc	gatggacttc	540
10	cagaaccacc	tgggcagctg	ccaaaagtgt	gatccaagct	gtcccaatgg	gagctgctgg	600
	ggtgcaggag	aggagaactg	ccagaaactg	accaaaatca	tctgtgcccc	gcagtgtctc	660
	gggcgctgcc	gtggcaagtc	ccccagtgac	tgctgccaca	accagtgtgc	tgccaggtgc	720
	acaggccccc	gggagagcga	ctgcctggtc	tgccgcaaat	tccgagacga	agccacgtgc	780
	aaggacacct	gccccccact	catgctctac	aacccccacca	cgtaccagat	ggatgtgaac	840
15	cccaggggca	aatacagctt	tggtgccacc	tgctgaaga	agtgtccccg	taattatgtg	900
	gtgacagatc	acggctcgtg	cgtccgagcc	tgtggggccg	acagctatga	gatggaggaa	960
	gacggcgctc	gcaagtgtaa	gaagtgcgaa	gggccttgcc	gcaaagtgtg	taacggaata	1020
	ggtattggtg	aatttaaaaga	ctcactctcc	ataaatgcta	cgaatattaa	acacttcaaa	1080
	aactgcacct	ccatcagtg	cgatctccac	atcctgccc	tggtcatttag	gggtgactcc	1140
20	ttcacacata	ctcctcctct	ggatccacag	gaactggata	ttctgaaaac	cgtaaaggaa	1200
	atcacagggt	ttttgtgat	tcaggcttgg	cctgaaaaca	ggacggacct	ccatgccttt	1260
	gagaacctag	aaatcatacg	cggcaggacc	aagcaacatg	gtcagttttc	tcttgacgtc	1320
	gtcagcctga	acataacatc	cttgggatta	cgctccctca	aggagataag	tgatggagat	1380
25	gtgataat	caggaaacaa	aaatttgtgc	tatgcaaaata	caataaaactg	gaaaaaactg	1440
	tttgggacct	ccggtcagaa	aaccaaaatt	ataagcaaca	gaggtgaaaa	cagctgcaag	1500
	gccacaggcc	aggtctgcca	tgcttgtg	tcccccgagg	gctgctgggg	cccggagccc	1560
	agggactgcg	tctcttgcg	gaatgtcagc	cgaggcagg	aatgctgtga	caagtgcag	1620
	cttctggagg	gtgagccaag	ggagtgtgtg	gagaactctg	agtgcataca	gtgccaccca	1680
	gagtgcctgc	ctcaggccat	gaacatcacc	tgacaggac	ggggaccaga	caactgtatc	1740
30	cagtgtgccc	actacattga	cgccccccac	tgctcaaga	cctgcccggc	aggagtcacg	1800
	ggagaaaaca	acaccttgg	ctggaagtac	gcagacgccg	gccatgtgtg	ccacctgtgc	1860
	catccaaact	gcacctacgg	atgcactggg	ccaggtcttg	aaggctgtcc	aacgaatggg	1920
	cctaagatcc	cgtccatcgc	cactgggatg	gtggggggcc	tctcttggct	gctgggtggg	1980
	gcccggggga	tcggcctctt	catgcgaagg	cgccacatcg	ttcggaagcg	cacgctgcg	2040
35	aggctgctgc	aggagaggga	gcttgtggag	cctcttacac	ccagtggaga	agctcccaac	2100
	caagctctct	tgaggatctt	gaaggaaact	gaattcaaaa	agatcaaagt	gctgggtctc	2160
	ggtgcgttcg	gcacggtgta	taagggaact	tggtatccag	aagggtgagaa	agttaaaatt	2220
	cccgtogcta	tcaagggaat	aagagaagca	acatctccga	aagccaacaa	ggaaatcctc	2280
	gatgaagcct	acgtgatggc	cagcgtggac	aacccccacg	tgtgccgctc	gctgggcac	2340
40	tgctcacct	ccaccgtgca	actcatcagc	cagctcatgc	cctctggctg	cctccctggac	2400
	tatgtccggg	aacacaaaga	caatattggc	tcccagtagc	tgctcaactg	gtgtgtgcag	2460
	atcgcaagg	gcatgaacta	cttggaggac	cgctcgcttg	tgacccgcga	cctggcagcc	2520
	aggaacgtac	tggtgaaaac	accgcagcat	gtcaagatca	cagatttttg	gctggccaaa	2580
	ctgctgggtg	cggaagagaa	agaataccat	gcagaaggag	gcaaagtggc	tatcaagtgg	2640
45	atggcattgg	aatcaatttt	acacagaatc	tatacccacc	agagtgatgt	ctggagctac	2700
	ggggtgaccg	tttgggagtt	gatgaccttt	ggatccaagc	catatgacgg	aatccctgcc	2760
	agcgagatct	cctccatcct	ggagaaagga	gaacgcctcc	ctcagccacc	catatgtacc	2820
	atcgatgtct	acatgatcat	ggtcaagtgc	tggtatgatg	acgcagatag	tcgcccacaa	2880
	ttccgtgagt	tgatcatcga	attctccaaa	atggcccag	acccccagcg	ctaccttgtc	2940
50	attcaggggg	atgaaagaat	gcatttgcca	agtcctacag	actccaactt	ctaccgtgac	3000
	ctgatggatg	aagaagacat	ggacgacgtg	gtggatggcg	acgagtacct	catcccacag	3060
	cagggtctct	tcagcagccc	ctccacgtca	cggactcccc	tcttgagctc	tctgagtgc	3120
	accagcaaca	attccaccgt	ggcttgcat	gatagaaatg	ggctgcaaa	ctgtcccatc	3180
	aaggaagaca	gcttcttgca	gcgatacagc	tcagacccca	caggcgctct	gactgaggac	3240
55	agcatagacg	acaccttctc	ccagtgctc	gaatacataa	accagtccgt	tcccaaaaag	3300
	cccgtgggct	ctgtgcagaa	tctgtcttat	cacaatcagc	ctctgaaccc	cgcccccagc	3360
	agagaccac	actaccagga	ccccacagc	actgcagtgg	gcaaccccg	gtatctcaac	3420
	actgtccagc	ccacctgtgt	caacagcaca	ttcgacagcc	ctgcccactg	ggcccagaaa	3480
	ggcagccacc	aaattagcct	ggacaaccct	gactaccagc	aggacttctt	tcccaaggaa	3540
60	gccaagccaa	atggcatctt	taagggtctc	acagctgaaa	atgcagaata	cctaagggtc	3600
	gcgccacaaa	gcagtgaatt	tattggagca	tga			3633

<210> 52
<211> 3768
<212> DNA
5 <213> Homo sapiens

<300>
<302> ERBB2
<310> NM004448
10

<400> 52
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctctctctcg cctctttgcc ccccgagacc 60
gcgagcacc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120
acccaqctgg acatgtctcg ccacctctac cagggctgcc aggtgggtgca gggaaacctg 180
15 gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggctacg tgcctcatcg tcacaaccaa gtgaggcagg tccactgca gaggtgcgg 300
attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggcctgtgt agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480
20 ctctgtctac aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
ggctcccgct gctggggaga gattctctgag gattgtcaga gcctgacgcy cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgtg caagggggcca ctgccactg actgctgcca tgagcagtg 720
gctgcccgtg gcacggggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780
25 agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacc acaacacaga cacgtttgag 840
tccatgcccc atcccaggg ccggtatata ttcggcgcca gctgtgtgac tgccctgtccc 900
tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcacctcg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgcacat 1080
30 atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttcagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320
tactcgctga ccctgcaagg gctgggcata agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380
35 ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgtctcgt gcacacggtg 1440
ccctggggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500
gaggacagtg gtgtggggcga gggcctggcc tgcccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560
tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620
gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc ccaggaggat atgtgaatgc caggcactgt 1680
40 ttgcccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgtgc 1800
cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccactc ggaagtttcc agatgaggag 1860
ggcgcatctc agccttgccc catcaactcc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagcctc ctgacgtcca tcttctctgc ggtggttggc 1980
45 attctgctgg tctgtgtctt gggggtgggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggg ggagccgctg 2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160
aggaaggtga agtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220
cctgatgggg agaattgtga aattccagtg gccataaag tgttgaggga aaacacatcc 2280
50 cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctgggtg gggctcccc 2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggg gacacagctt 2400
atgcccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520
ctcgtacaca gggacttggc cgtcgggaac gtgctgggtc agagtcccaa ccatgtcaaa 2580
55 attacagact tgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640
gggggcaagg tgcccacaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccc gcggttcacc 2700
caccagagtg atgtgtggag ttatgggtgt actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760
aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820
ctgcccacag ccccatctg caccattgat gtctacatga tcatgggtcaa atgttggatg 2880
60 attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagggtgtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtccctgt 3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060

5 gaggagtatc tggtaaccca gcaggggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120
 ggcattggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180
 ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggctct cactggcacc ctccgaaggg 3240
 gctggctccg atgtatttga tggtagacct ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300
 ctccccacac atgaccccag ccctctacag ggttacagt aggaccccac agtacccttg 3360
 ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctagacctga gccccagcc tgaatatgtg 3420
 aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480
 cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540
 gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600
 10 ttactactggg accaggacct ccacccctct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660
 tattactggg accaggacct ccacaggcgg ggggctccac ccagcacctt caaaggggaca 3720
 cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768

15 <210> 53
 <211> 1986
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <300>
 <302> ERBB3
 <310> XM006723

25 <400> 53
 atgcacaact tcagtgtttt ttccaatttg acaaccattg gaggcagaag cctctacaac 60
 cggggcttct cattgttgat catgaagaac ttgaatgtca catctctggg cttccgatcc 120
 ctgaaggaaa ttagtgctgg gcgtatctat ataagtcca ataggcagct ctgctaccac 180
 cactctttga actggaccaa ggtgcttcgg gggcctacgg aagagcgact agacatcaag 240
 cataatcggc cgcgagaga ctgctgggca gagggcaaa tgtgtgacct actgtgctcc 300
 30 tctgggggat gctggggccc agggccttgt cagtgttgt cctgtcgaat ttatagccga 360
 ggaggtgtct gtgtgaccca ctgcaacttt ctgaatgggg agcctcgaga atttgcccac 420
 gaggccgaat gcttctctcg ccacccggaa tgccaaccca tggagggcac tgccacatgc 480
 aatggctcgg gctctgatac ttgtgtctca tgtgccatt ttcgagatgg gccccatgt 540
 gtgagcagct gccccatgg agtcctaggt gccaaaggcc caatctacaa gtaccagat 600
 35 gttcagaatg aatgtcggcc ctgccatgag aactgcaccc aggggtgtaa aggaccagag 660
 cttcaagact gtttaggaca aacactgggt ctgatcgcca aaaccatct gacaatggct 720
 ttgacagtga tagcaggatt ggtagtgtat ttcatgatgc tgggcggcac ttttctctac 780
 tggcgtgggc gccggattca gaataaaagg gctatgagg gatacttga acggggtgag 840
 agcatagagc ctctggacct cagtgagaag gctaacaagg tcttggccag aatcttcaaa 900
 40 gagacagagc taaggaagct taaagtgtct ggctcgggtg tctttggaac tgtgcacaaa 960
 ggagtgtgga tccctgaggg tgaatcaatc aagattccag tctgcattaa agtcattgag 1020
 gacaagagtg gacggcagag ttttcaagct gtgacagatc atatgctggc cattggcagc 1080
 ctggaccatg cccacattgt aaggctgtct ggactatgcc cagggtcatc tctgcagctt 1140
 gtcactcaat atttgctct ggggttctct ctggatcatg tgagacaaca ccggggggca 1200
 45 ctggggccac agctgctgct caactgggga gtacaaattg ccaagggaat gtactacctt 1260
 gaggaacatg gtatggtgca tagaaacctg gctgcccga acgtgctact caagtcaccc 1320
 agtcaggttc aggtggcaga ttttggtgtg gctgacctgc tgcctcctga tgataagcag 1380
 ctgctataca gtgaggccaa gactccaatt aagtggatgg cccttgagag tatccacttt 1440
 50 gggaataaca cacaccagag tgaatgtctg agctatgggt tgacagtgtg ggagttgatg 1500
 accctcgggg cgagacccta tgcagggtca cgattggctg aagtaccaga cctgctagag 1560
 aagggggagc ggttggcaca gcccagatc tgcacaattg atgtctacat ggtgatggtc 1620
 aagtgttgga tgattgatga gaacattcgc ccaaccttta aagaactagc caatgagttc 1680
 accaggatgg cccgagaccc accacgggat ctggtcataa agagagagag tgggacctgga 1740
 atagcccctg ggccagagcc ccatggctctg acaaaacaaga agctagagga agtagagctg 1800
 55 gagccagaac tagacctaga cctagacttg gaagcagagg aggacaacct ggcaaccacc 1860
 acactgggct ccgcccctag cctaccagtt ggaacactta atcgccacg tggggccag 1920
 agccttttaa gtccatcatc tggatacatg cccatgaacc agggtaattc tgggggttctt 1980
 ccttag 1986

60 <210> 54
 <211> 1437

<212> DNA
<213> Homo sapiens

5 <300>
<302> ERBB4
<310> XM002260

<400> 54
10 atgatgtacc tggaagaaag acgactcggt catcgggatt tggcagcccg taatgtctta 60
gtgaaatctc caaaccatgt gaaaatcaca gattttgggc tagccagact cttggaagga 120
gatgaaaaag agtacaatgc tgatggagga aagatgccaa tttaatggat ggctctggag 180
tgtatacatt acaggaaatt caccatcag agtgacgttt ggagctatgg agttactata 240
tgggaaactga tgacctttgg aggaaaaccc tatgatggaa ttccaacgcg agaaatccct 300
gatttattag agaaaggaga acgtttgcct cagcctccca tctgcactat tgacgtttac 360
15 atggtcatgg tcaaatgttg gatgattgat gctgacagta gacctaaatt taaggaactg 420
gctgctgagt tttcaaggat ggctcgagac cctcaaagat acctagtatt tcagggtgat 480
gatcgtatga agcttcccag tccaaatgac agcaagttct ttcagaatct cttggatgaa 540
gaggatttgg aagatatgat ggatgctgag gactacttgg tccctcaggc tttcaacatc 600
20 ccacctccca tctatacttc cagagcaaga attgactcga ataggagtga aattggacac 660
agccctcctc ctgcctacac ccccatgtca ggaaaccagt ttgtataccg agatggaggt 720
tttctgctg aacaaggagt gtctgtgccc tacagagccc caactagcac aattccagaa 780
gctcctgtgg cacagggtgc tactgctgag atttttgatg actcctgctg taatggcacc 840
ctacgcaagc cagtggcacc ccatgtccaa gaggacagta gcaccagag gtacagtgtc 900
25 gacccacccg tgtttgcccc agaacggagc ccacgaggag agctggatga ggaagggttac 960
atgactccta tgcgagacaa acccaaacaa gaatacctga atccagtggg ggagaaccct 1020
tttgtttctc ggagaaaaaa tggagacctt caagcattgg ataatcccga atatcacaat 1080
gcatccaatg gtccacccaa ggccgaggat gagtatgtga atgagccact gtacctcaac 1140
acctttgcca acaccttggg aaaagctgag tacttgaaga acaacatact gtcaatgccg 1200
30 gagaaggcca agaaagcgtt tgacaaccct gactactgga accacagcct gccacctcgg 1260
agcacccttc agcaccacga ctacctgcag gactacagca caaaatattt ttataaacag 1320
aatgggcgga tccggcctat tgtggcagag aatcctgaat acctctctga gttctccctg 1380
aagccaggca ctgtgctgcc gcctccacct tacagacacc ggaatactgt ggtgttaa 1437

35 <210> 55
<211> 627
<212> DNA
<213> Homo sapiens

40 <300>
<302> FGF10
<310> NM004465

<400> 55
45 atgtggaaat ggatactgac acatttgtgcc tcagcctttc cccacctgcc cggtgctgctc 60
tgctgctgct ttttgttgct gttcttgggt tcttccgtcc ctgtcacctg ccaagccctt 120
ggtcaggaca tgggtgcacc agaggccacc aactcttctt cctcctcctt ctcctctcct 180
tccagcgcgg gaaggcatgt gcggagctac aatcaccttc aaggagatgt ccgctggaga 240
50 aagctattct ctttcaccaa gtactttctc aagattgaga agaacgggaa ggtcagcggg 300
accaagaagg agaactgccc gtacagcatc ctggagataa catcagtaga aatcgagtt 360
gttgccgtca aagccattaa cagcaactat tacttagcca tgaacaagaa ggggaaactc 420
tatggctcaa aagaatttaa caatgactgt aagctgaagg agaggataga ggaaaatgga 480
tacaatacct atgcatcatt taactggcag cataatggga ggcaaatgta tgtggcattg 540
60 aatggaaaag gagtccaag gagaggacag aaaacacgaa ggaaaaacac ctctgctcac 600
55 tttcttccaa tgggtgtaca ctcatag 627

<210> 56
<211> 679
60 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF11
 <310> XM008660

5 <400> 56
 aatggcgccg ctggccagta gcctgatccg gcagaagcgg gaggtccgag agcccggggg 60
 cagccggccg gtgtcggcgc agcggcgcggt gtgtcccccgc ggcaccaagt ccctttgccca 120
 gaagcagctc ctcatcctgc tgtccaagggt gcgactgtgc gggggggcggc ccgcgcgggcc 180
 ggaccgcggc cgggagcctc agctcaaagg catcgtcacc aaactgttct gccgccaggg 240
 10 tttctacctc caggcgaatc ccgacggaag catccagggc accccagagg ataccagctc 300
 cttcacccac ttcaacctga tccctgtggg cctccgtgtg gtcaccatcc agagcgccaa 360
 gctgggtcac tacatggcca tgaatgctga gggactgctc tacagttcgc cgcatttcac 420
 agctgagtgt cgctttaagg agtgtgtctt tgagaattac tacgtcctgt acgcctctgc 480
 tctctaccgc cagcgtcgtt ctggccgggc ctggtacctc ggcctggaca aggagggcca 540
 15 ggtcatgaag ggaaaccgag ttaagaagac caaggcagct gcccactttc tgcccaagct 600
 cctggagggtg gccatgtacc aggagccttc tctccacagt gtcccagagg cctccccctc 660
 cagtccccct gccccctga 679

20 <210> 57
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <300>
 <302> FGF12
 <310> NM021032

30 <400> 57
 atggctgagg cgatagccag ctcccttgatc cggcagaagc ggcaggcgag ggagtccaac 60
 agcgaccgag tgtcggcctc caagcgccgc tccagcccca gcaaagacgg ggcgtccctg 120
 tgcgagaggg acgtcctcgg ggtgttcagc aaagtgcgct tctgcagcgg ccgcaagagg 180
 ccggtgaggg ggagaccaga accccagctc aaagggattg tgacaagggt attcagccag 240
 cagggatact tcctgcagat gcaccagat ggtaccattg atgggaccaa ggacgaaaac 300
 35 agcgactaca ctctcttcaa tctaattccc gtgggcctgc gtgtagtggc catccaaggga 360
 gtgaaggcta gcctctatgt ggccatgaat ggtgaaggct atctctacag ttcagatgtt 420
 ttactctcag aatgcaaatt caaggaatct gtgtttgaaa actactatgt gatctattct 480
 tccacactgt accgccagca agaatcaggc cgagcttggg ttctgggact caataaagaa 540
 ggtcaaatta tgaaggggaa cagagtgaag aaaaccaagc cctcatcaca ttttgtaccg 600
 40 aaacctattg aagtgtgtat gtacagagaa ccatcgctac atgaaattgg agaaaaacaa 660
 gggcggttcaa ggaaaagttc tggaacacca accatgaatg gaggcaaagt tgtgaatcaa 720
 gattcaacat ag 732

45 <210> 58
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <300>
 <302> FGF13
 <310> XM010269

55 <400> 58
 atggcgggcg ctatcgccag ctcgctcatc cgtcagaaga ggcaagcccg cgagcgcgag 60
 aaatccaacg cctgcaagtg tgtcagcagc ccagcaaaag gcaagaccag ctgcgacaaa 120
 aacaagttaa atgtcttttc ccgggtcaaa ctcttcgggt ccaagaagag gcgcagaaga 180
 agaccagagc ctgagcttaa gggatatagt accaagctat acagccgaca aggctaccac 240
 ttgcagctgc aggcggatgg aaccattgat ggcaccaaag atgaggacag cacttacact 300
 60 ctgtttaacc tcactccctgt gggctcgcga gtgggtggcta tccaaggagt tcaaaccaag 360
 ctgtacttgg caatgaacag tgagggatac ttgtacacct cggaactttt cacacctgag 420
 tgcaaatcca aagaatcagt gtttgaaaat tattatgtga catattcatc aatgatatac 480

	cgtcagcagc	agtcaggccg	agggtggtat	ctgggtctga	acaaagaagg	agagatcatg	540
	aaaggcaacc	atgtgaagaa	gaacaagcct	gcagctcatt	ttctgcctaa	accactgaaa	600
	gtggccatgt	acaaggagcc	atcactgcac	gatctcacgg	agttctcccg	atctggaagc	660
5	gggaccccaa	ccaagagcag	aagtgtctct	ggcgtgctga	acggaggcaa	atccatgagc	720
	cacaatgaat	caacgtag					738
	<210>	59					
	<211>	624					
10	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF16					
15	<310>	NM003868					
	<400>	59					
	atggcagagg	tggggggcgt	cttcgcctcc	ttggactggg	atctacacgg	cttctcctcg	60
	tctctgggga	acgtgccctt	agctgactcc	ccaggtttcc	tgaacgagcg	cctggggccaa	120
20	atcgagggga	agctgcagcg	tggctcacc	acagacttcg	cccacctgaa	ggggatcctg	180
	cggcgccgcc	agctctactg	ccgcaccggc	ttccacctgg	agatcttccc	caacggcacg	240
	gtgcacggga	cccggcacga	ccacagccgc	ttcggaatcc	tggagtttat	cagcctggct	300
	gtggggctga	tcagcatccg	gggagtggac	tctggcctgt	acctaggaat	gaatgagcga	360
	ggagaactct	atgggtcgaa	gaaactcaca	cgtgaatgtg	ttttccggga	acagtgtgaa	420
25	gaaaactggt	acaacacctt	tgcctcaacc	ttgtacaaac	attcggactc	agagagacag	480
	tattacgtgg	ccctgaacaa	agatggctca	ccccgggagg	gatacaggac	taaacgacac	540
	cagaaattca	ctcacttttt	accaggcct	gtagatcctt	ctaagttgcc	ctccatgtcc	600
	agagacctct	ttcactatag	gtaa				624
	<210>	60					
	<211>	651					
	<212>	DNA					
35	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF17					
	<310>	XM005316					
	<400>	60					
	atgggagccg	cccgcctgct	gccccacctc	actctgtgct	tacagctgct	gattctctgc	60
	tgtcaaaactc	agggggagaa	tcaccctgct	cctaatttta	accagtacgt	gagggaccag	120
	ggcgccatga	ccgaccagct	gagcaggcgg	cagatccgcg	agtaccaact	ctacagcagg	180
	accagtggga	agcacgtgca	ggtcaccggg	cgtcgcctct	ccgccaccgc	cgaggacggc	240
45	aacaagtttg	ccaagctcat	agtggagacg	gacacgtttg	gcagccgggt	tcgcatacaa	300
	ggggctgaga	gtgagaagta	catctgtatg	aacaagaggg	gcaagctcat	cgggaagccc	360
	agcgggaaga	gcaaagactg	cgtgttcacg	gagatcgtgc	tggagaacaa	ctatacggcc	420
	ttccagaacg	cccggcacga	gggctggttc	atggccttca	cgcggcaggg	gcggccccgc	480
	caggcttccc	gcagccgcca	gaaccagcgc	gaggccact	tcataaagcg	cctctaccaa	540
50	ggccagctgc	ccttccccaa	ccacgccgag	aagcagaagc	agttcgagtt	tgtgggctcc	600
	gccccccacc	gccggaccaa	gcgcacacgg	cggccccagc	ccctcacgta	g	651
	<210>	61					
	<211>	624					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF18					
60	<310>	AF075292					

<400> 61
 atgtattcag cgccctccgc ctgcacttgc ctgtgtttac acttcctgct gctgtgcttc 60
 caggtacagg tgctgggtgc cgaggagaac gtggacttcc gcatccacgt ggagaaccag 120
 acgcgggctc gggacgatgt gagccgtaag cagctgcggc tgtaccagct ctacagccgg 180
 5 accagtggga aacacatcca ggtcctgggc cgcaggatca gtgccgcgg cgaggatggg 240
 gacaagtatg cccagctcct agtggagaca gacaccttcg gtagtcaagt ccggatcaag 300
 ggcaaggaga cggaattcta cctgtgcatg aaccgcaaag gcaagctcgt ggggaagccc 360
 gatggcacca gcaaggagtg tgtgttcacg gagaagggtc tggagaacaa ctacacggcc 420
 ctgatgtcgg ctaagtactc cggctggtag gtgggcttca ccaagaaggg gcgccgcgg 480
 10 aaggggccca agaccggga gaaccagcag gacgtgcatt tcatgaagcg ctacccaag 540
 gggcagccgg agcttcagaa gcccttcaag tacacgacgg tgaccaagag gtcccgtcgg 600
 atccggccca cacaccctgc ctag 624

15 <210> 62
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <300>
 <302> FGF19
 <310> AF110400

25 <400> 62
 atgcggagcg ggtgtgtggt ggtccacgta tggatcctcg ccggcctctg gctggccgtg 60
 gccggggcgcc ccctcgcctt ctccggacgc gggccccacg tgcactacgg ctggggcgac 120
 cccatccgcc tgcggcacct gtacacctcc gggccccacg ggctctccag ctgcttcctg 180
 cgcacccgtg ccgacggcgt cgtggactgc gcgcggggcc agagcgcgca cagtttgctg 240
 gagatcaagg cagtgcctct gcggaccgtg gccatcaagg gcgtgcacag cgtgcgttac 300
 30 ctctgcatgg gcgccgacgg caagatgcag gggctgcttc agtactcgga ggaagactgt 360
 gctttcgagg aggagatccg cccagatggc tacaatgtgt accgatccga gaagcacgc 420
 ctcccggtct ccctgagcag tgccaaacag cggcagctgt acaagaacag aggctttctt 480
 ccactctctc atttcctgcc catgctgcc atggtcccag aggagcctga ggacctcagg 540
 ggccacttgg aatctgacat gttctcttcg cccctggaga ccgacagcat ggacctattt 600
 35 gggcttgtca ccggactgga ggccgtgagg agtcccagct ttgagaagta a 651

40 <210> 63
 <211> 468
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <400> 63
 atggctgaag gggaaatcac caccttcaca gccctgaccg agaagtttaa tctgcctcca 60
 ggggaattaca agaagcccaa actcctctac tgtagcaacg ggggccactt cctgaggatc 120
 cttccggatg gcacagtggg tgggacaagg gacaggagcg accagcacat tcagctgcag 180
 ctcaagtgcg aaagcgtggg ggaggtgtat ataaagagta ccgagactgg ccagtacttg 240
 gccatggaca ccgacgggct tttatacggc tcacagacac caaatgagga atgtttgttc 300
 ctggaaaggc tggaggagaa ccattacaac acctatatat ccaagaagca tgcagagaag 360
 50 aattggtttg ttggcctcaa gaagaatggg agctgcaaac gcggtcctcg gactcactat 420
 ggccagaaaag caatcttggt tctccccctg ccagtctctt ctgattaa 468

55 <210> 64
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

60 <300>
 <302> FGF20
 <310> NM019851

<400> 64
 atggctccct tagccgaagt cgggggcttt ctgggaggcc tggagggtt gggccagcag 60
 gtgggttcgc atttcctgtt gcctcctgcc ggggagcggc cgccgctgct gggcgagcgc 120
 5 agggagcgcg cggagcggag cgcgcgcggc gggccggggg ctgcgcagct ggcgcacctg 180
 cacggcatcc tgcgcgcggc gcagctctat tgccgcaccg gcttccacct gcagatcctg 240
 cccgacggca gcgtgcaggg caccggcgag gaccacagcc tcttcggtat cttggaattc 300
 atcagtgtgg cagtgggact ggtcagtatt agagggtgtg acagtgggtc ctatccttga 360
 atgaatgaca aaggagaact ctatggatca gagaaactta cttccgaatg catcttttag 420
 10 gagcagtttg aagagaactg gtataacacc tattcatcta acatatataa acatggagac 480
 actggccgca ggtattttgt ggcacttaac aaagacggaa ctccaagaga tggcgccagg 540
 tccaagaggc atcagaaaatt tacacatttc ttacctagac cagtggatcc agaaagagtt 600
 ccagaattgt acaaggacct actgatgtac acttga 636

15 <210> 65
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <300>
 <302> FGF21
 <310> XM009100

25 <400> 65
 atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggg 60
 cttctgctgg gaggcctgcc ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc 120
 gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac 180
 ctggagatca gggaggatgg gacgggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc 240
 30 ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaattc tgggagtcaa gacatccagg 300
 ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc 360
 tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420
 ggcctcccgc tgcacctgcc agggaaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480
 ccagctcgct tccctgccact accaggcctg ccccccgcac tcccggagcc acccggaatc 540
 ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc 600
 35 cagggccgaa gccccagcta cgcttctctga 636

40 <210> 66
 <211> 513
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <300>
 <302> FGF22
 <310> XM009271

50 <400> 66
 atgcgcggcc gcctgtggct gggcctggcc tggctgctgc tggcgcgggc gccggacgcc 60
 gcgggaaccc cgagcgcgtc gcggggaccg cgcagctacc cgcacctgga gggcgacgtg 120
 cgctggcggc gcctcttctc ctccactcac ttcttctgct gcgtggatcc cggcgccgcg 180
 gtgcagggca cccgctggcg ccacggccag gacagcatcc tggagatccg ctctgtacac 240
 gtgggcgtcg tggatcaca agcagtgtcc tcaggcttct acgtggccat gaaccgcccg 300
 ggcgcctct acgggtcgcg actctacacc gtggactgca ggttccggga gcgcacgaa 360
 55 gagaacggcc acaacacctc cgcctcacag cgctggcgcc gccgcggcca gcccatgttc 420
 ctggcgctgg acaggagggg ggggccccgg ccaggcgggc ggacgcggcg gtaccacctg 480
 tccgccact tctgtcccg cctggtctcc tga 513

60 <210> 67
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
<302> FGF4
<310> NM002007

5

<400> 67
atgtcggggc cccgggacggc cgcggtagcg ctgctcccgg cggtcctgct ggccttgctg 60
gcgccctggg cgggcccagg gggcgccgcc gcacccactg caccacaacg cagctggag 120
gccgagctgg agcgcgcgct ggagagcctg gtggcgctct cgttggcgcg cctgccggtg 180
10 gcagcgcagc ccaaggaggc ggccgtccag agcggcgccg gcgactacct gctgggcatc 240
aagcggctgc ggcggctcta ctgcaacgtg ggcacggct tccacctcca ggcgctcccc 300
gacggccgca tcggcggcgc gcacgcggac acccgcgaca gcctgctgga gctctcgccc 360
gtggagcggg gcgtggtgag catcttcggc gtggccagcc ggttcttcgt ggccatgagc 420
agcaagggca agctctatgg ctgcgccctt ttcaccgatg agtgacggt caaggagatt 480
15 ctcccttcca acaactacaa cgcctacgag tcctacaagt acccggcat gttcatcgcc 540
ctgagcaaga atgggaagac caagaagggg aaccgagtg cgcccaccat gaaggtcacc 600
cacttcctcc ccaggctgtg a 621

20 <210> 68
<211> 597
<212> DNA
<213> Homo sapiens

25 <300>
<302> FGF6
<310> NM020996

<400> 68
30 atgtcccggg gagcaggacg tctgcagggc acgctgtggg ctctcgtctt cctaggcatc 60
ctagtgggca tgggtggtgcc ctgcctgca ggcacccgtg ccaacaacac gctgctggac 120
tcgaggggct ggggcaccct gctgtccagg tctcgcgcgg ggctagctgg agagattgcc 180
ggggtgaact gggaaagtgg ctatttggtg gggatcaagc ggcagcggag gctctactgc 240
aacgtgggca tcggctttca cctccagggtg ctccccgacg gccggatcag cgggaccac 300
35 gaggagaacc cctacagcct gctggaaatt tccactgtgg agcgaggcgt ggtgagtctc 360
tttgagtgga gaagtgcctt ctctggtgcc atgaacagta aaggaagatt gtacgcaacg 420
cccagcttcc aagaagaatg caagttcaga gaaaccctcc tgccaacaa ttacaatgcc 480
tacgagtcag acttgtagca agggacctac attgccctga gcaaatacgg acgggtaaag 540
40 cggggcagca aggtgtcccc gatcatgact gtcactcatt tccttcccag gatctaa 597

<210> 69
<211> 150
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens

<300>
<302> FGF7
<310> XM007559

50 <400> 69
atgtcttggc aatgcacttc atacacaatg actaatctat actgtgatga tttgactcaa 60
aaggagaaaa gaaattatgt agttttcaat tctgattcct attcaccttt tgtttatgaa 120
55 tggaaagctt tgtgcaaaat atacatataa 150

<210> 70
<211> 628
<212> DNA
60 <213> Homo sapiens

<300>

<302> FGF9
<310> XM007105

<400> 70
5 gatggctccc ttaggtgaag ttgggaacta tttcgggtgtg caggatgcgg taccgtttgg 60
gaatgtgccc gtgttgccgg tggacagccc gggtttgtta agtgaccacc tgggtcagtc 120
cgaagcaggg gggctcccca ggggacccgc agtcacggac ttggatcatt taaaggggat 180
tctcaggcgg aggcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg 240
tactatccag ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat 300
10 agcagtgggc ctgggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga 360
gaagggggag ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt 420
cgaagaaaac tgggtataata cgtactcatc aaacctatat aagcacgtgg aacttggaag 480
gcgatactat gttgcattaa ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg 540
gcaccagaaa ttcacacatt ttttacctag accagtggac cccgacaaag tacctgaact 600
15 gtataaggat attctaagcc aaagttga 628

<210> 71
<211> 2469
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> FGFR1
25 <310> NM000604

<400> 71
atgtggagct ggaagtgcct cctcttcttg gctgtgctgg tcacagccac actctgcacc 60
gctaggccgt ccccgacctt gcctgaacaa gccagccct ggggagcccc tgtggaagtg 120
30 gagtccttcc tgggtccaccc cggtagcctg ctgcagcttc gctgtcggct gcgggacgat 180
gtgcagagca tcaactggct gcgggacggg gtgcagctgg cggaaagcaa ccgcacccgc 240
atcacagggg aggaggtgga ggtgcaggac tccgtgcccg cagactccgg cctctatgct 300
tgcgtaacca gcagccctc gggcagtgac accacctact tctccgtcaa tgtttcagat 360
gctctcccct cctcggagga tgatgatgat gatgatgact cctcttcaga ggagaaaaga 420
35 acagataaca ccaaaccaaa ccgtatgccc gtagctccat attggacatc cccagaaaag 480
atggaaaaga aattgcatgc agtgccggct gccaaagacag tgaagttcaa atgcccttcc 540
agtgggacct caaaccacc actgcgctgg ttgaaaaatg gcaagaatt caaacctgac 600
cacagaattg agggctacaa ggtccgttat gccacctgga gcatcataat ggactctgtg 660
gtgccctctg acaagggcaa ctacacctgc attgtggaga atgagtacgg cagcatcaac 720
40 cacacatacc agctggatgt cgtggagcgg tccctcacc ggcccatcct gcaagcaggg 780
ttgcccgcca acaaaacagt ggccctgggt agcaacgtgg agttcatgtg taagggtgtac 840
agtgaaccgc agccgcacat ccagtggcta aagcacatcg aggtgaatgg gagcaagatt 900
ggcccagaca acctgcctta tgtccagatc ttgaagactg ctggagttaa taccaccgac 960
aaagagatgg aggtgcttca cttaagaaat gtctcctttg aggacgcagg ggagtatacg 1020
45 tgcttggcgg gtaactctat cggactctcc catcactctg catggttgac cgttctggaa 1080
gccctggaag agaggccggc agtgatgacc tgcgccctgt acctggagat catcatctat 1140
tgcacagggg ccttcctcat ctccctgatg gtggggctcg tcatcgtcta caagatgaag 1200
agtggtagcc agaagagtga ctccacagc cagatggctg tgcacaagct ggccaagagc 1260
atccctctgc agagacaggt aacagtgtct gctgactcca gtgcatccat gaactctggg 1320
50 gttcttcttg ttccggccatc acggctctcc tccagtggga ctcccatgct agcaggggtc 1380
tctgagtatg agcttcccga agaccctcgc tgggagctgc ctccggacag actggtctta 1440
ggcaaacccc tgggagaggg ctgctttggg caggttggtg tggcagaggg tatcgggctg 1500
gacaaggaca aacccaaccg tgtgacaaa gtggctgtga agatgttgaa gtcggacgca 1560
acagagaaag acttgtcaga cctgatctca gaaatggaga tgatgaagat gatcgggaag 1620
55 cataagaata tcatcaacct gctgggggcc tgcacgcagg atggtccctt gtatgtcatc 1680
gtggagtatg cctccaaggg caacctgcgg gactacctgc agggccggag gccccaggg 1740
ctggaatact gctacaaccc cagccacaac ccagaggagc agctctcctc caaggacctg 1800
gtgtcctgcg cctaccaggt ggcccgaggc atggagtatc tggcctccaa gaagtgcata 1860
caccagacc tggcagccag gaatgtcctg gtgacagagg acaatgtgat gaagatagca 1920
60 gactttggcc tgcacggga cattcaccac atcgactact ataaaaagac aaccaaccgc 1980
cgactgcctg tgaagtggat ggaccccgag gcattatttg accggatcta caccaccag 2040
agtgatgtgt ggtctttcgg ggtgctcctg tgggagatct tcaactctggg cggctcccca 2100

	taccocgggtg	tgccctgtgga	ggaacttttc	aagctgtctga	aggagggtca	ccgcatggac	2160
	aagcccagta	actgcaccaa	cgagctgtac	atgatgatgc	gggactgctg	gcatgcagtg	2220
	ccctcacaga	gacccacctt	caagcagctg	gtggaagacc	tggaccgcat	cgtggccttg	2280
5	acctccaacc	aggagtacct	ggacctgtcc	atgcccctgg	accagtactc	ccccagcttt	2340
	cccgacaccc	ggagctctac	gtgctcctca	ggggaggatt	ccgtctttctc	tcattgagccg	2400
	ctgcccggag	agccctgcct	gccccgacac	ccagcccagc	ttgccaatgg	cggactcaaa	2460
	cgccgctga						2469
10	<210> 72						
	<211> 2409						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<300>						
	<302> FGFR4						
	<310> XM003910						
	<400> 72						
20	atcgggctgc	tgctggccct	gttgggggtc	ctgctgagtg	tgccctgggcc	tccagtcttg	60
	tccctggagg	cctctgagga	agtggagctt	gagccctgcc	tggtctccag	cctggagcag	120
	caagagcagg	agctgacagt	agcccttggg	cagcctgtgc	ggctgtgctg	tggggcgggt	180
	gagcgtgggtg	gccactggta	caaggaggggc	agtcgcctgg	cacctgctgg	ccgtgtacgg	240
25	ggctggaggg	gccgcctaga	gattgccagc	ttcctacctg	aggatgctgg	ccgctacctc	300
	tgccctggcac	gaggtctccat	gatcgtctctg	cagaatctca	ccttgattac	aggtgactcc	360
	ttgacctcca	gcaacgatga	tgaggacccc	aagtcccata	gggacctctc	gaataggcac	420
	agttaccccc	agcaagcacc	ctactggaca	cacccccagc	gcatggagaa	gaaactgcac	480
	gcagtacctg	cggggaacac	cgtcaagtcc	cgctgtccag	ctgcaggcaa	ccccacggcc	540
	accatccgct	ggcttaagga	tggacaggcc	tttcatgggg	agaaccgcat	tggaggcatt	600
30	cggctgcgcc	atcagcactg	gagtctcgtg	atggagagcg	tggtgccctc	ggaccgcggc	660
	acatacacct	gcctggtaga	gaacgctgtg	ggcagcatcc	gttataacta	cctgctagat	720
	gtgctggagc	ggtccccgca	ccggcccatc	ctgcaggccg	ggctccccgc	caacaccaca	780
	gccgtgggtg	gcagcgacgt	ggagctgctg	tgcaagggtg	acagcgatgc	ccagccccc	840
	atccagtggc	tgaagcacat	cgtcatcaac	ggcagcagct	tccgagccga	cgggtttccc	900
35	tatgtgcaag	tcctaaagac	tgcagacatc	aatagctcag	aggtggaggt	cctgtacctg	960
	cggaaactgt	cagccgagga	cgcaggcgag	tacacttgcc	tcgcaggcaa	ttccatcgcc	1020
	ctctcctacc	agtcctgctg	gctcacgggt	ctgccagagg	aggacccac	atggaccgca	1080
	gcagcggccg	agggcaggta	tacggacatc	atcctgtacg	cgtcgggctc	cctggccttg	1140
40	gctgtgctcc	tgctgctggc	caggctgtat	cgaggggcagg	cgctccacgg	ccggcacccc	1200
	cgcccggccc	ccactgtgca	gaagctctcc	cgcttccctc	tgggccgaca	gttctccctg	1260
	gagtcaggct	cttccggcaa	gtcaagctca	tccttggtac	gaggcgtgcg	tctctcctcc	1320
	agcggccccc	ccttgctcgc	cggcctcgtg	agtctagatc	tacctctcga	ccactatgg	1380
	gagttccccc	gggacaggct	ggtgcttggg	aagcccttag	gcgagggtcg	ctttggccag	1440
45	gtagtacgtg	cagaggccct	tggcatggac	cctgcccggc	ctgaccaagc	cagcactgtg	1500
	gccgtcaaga	tgctcaaaga	caacgcctct	gacaaggacc	tgggcgacct	ggtctcggag	1560
	atggagggtg	tgaagctgat	cggccgacac	aagaacatca	tcaacctgct	tggtgtctgc	1620
	accaggaag	ggccctctga	cgtgatcgtg	gagtgccgg	ccaaggga	cctgcccggg	1680
	ttcctcgggg	cccgcgcccc	accaggcccc	gacctcagcc	ccgacggtcc	tccggagcag	1740
50	gagggggccg	tctccttccc	agtcctggtc	tcctgcgcct	accagggtgc	ccgaggcatg	1800
	cagtatctgg	agtcccgga	gtgtatccac	cgggacctgg	ctgcccga	tgtgtgggtg	1860
	actgaggaca	atgtgatgaa	gattgctgac	tttgggctgg	ccgcggcgct	ccaccacatt	1920
	gactactata	agaaaaccag	caacggccgc	ctgcctgtga	agtggatggc	gcccagggcc	1980
	ttgtttgacc	gggtgtacac	acaccagagt	cagctgtggt	cttttgggat	cctgctattg	2040
55	gagatcttca	ccctcggggg	ctcccagtat	cctgcatatc	ccgtggagga	gctgttctcg	2100
	ctgctgcggg	agggacatcg	gatggaccga	ccccacact	gcccccaaga	gctgtacggg	2160
	ctgatgcgtg	agtgtggga	cgcagcggcc	tcccagaggc	ctaccttcaa	gcagctgggtg	2220
	gaggcgctgg	acaaggctct	gctggccgtc	tctgaggagt	acctcgacct	ccgcctgacc	2280
	ttcggacctt	attccccctc	tggtggggac	gccagcagca	cctgctcctc	cagcgattct	2340
60	gtcttccagc	acgacccccct	gccattggga	tccagctcct	tccccttcgg	gtctgggggtg	2400
	cagacatga						2409

<210> 73
<211> 1695
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5

<300>
<302> MT2MMP
<310> D86331

10

<400> 73
atgaagcggc cccgctgtgg ggtgccagac cagttcgggg tacgagtga agccaacctg 60
cggcggcgctc ggaagcgcta cgccctcacc gggagggaagt ggaacaacca ccactctgacc 120
tttagcatcc agaactacac ggagaagtgt ggctgggtacc actcgatgga ggcggtgcgc 180
agggccttcc gcgtgtggga gcaggccacg cccctgggtct tccaggaggt gccctatgag 240
15 gacatccggc tgcggcgaca gaaggaggcc gacatcatgg tactctttgc ctctggcttc 300
cacggcgaca gctcgccggt tgatggcacc ggtggcttcc tggccacgc ctatttccct 360
ggccccggcc taggcgggga caccatttt gacgcagatg agccctggac cttctccagc 420
actgacctgc atggaaacaa cctcttcctg gtggcagtgc atgagctggg ccacgcgctg 480
gggctggagc actccagcaa cccaatgcc atcatggcg cggttctacca gtggaaggac 540
20 gttgacaact tcaagctgcc cgaggacgat ctccgtggca tccagcagct ctacgggtacc 600
ccagacgggtc agccacagcc taccagcct ctcccactg tgacgccacg gcggccaggc 660
cggcctgacc accggccgcc cggcctccc cagccaccac cccaggtgg gaagccagag 720
cggcccccaa agcggggccc cccagtcag ccccgagcca cagagcggcc cgaccagtat 780
ggccccaaaca tctgcgacgg ggactttgac acagtggcca tgcttcgagg ggagatgttc 840
25 gtgttcaagg gccgctggtt ctggcgagtc cggcacaacc gcgtcctgga caactatccc 900
atgcccatcg ggcacttctg gcgtggtctg cccggtgaca tcagtgtctg ctacgagcgc 960
caagacgggtc gttttgtctt tttcaaagg gaccgctact ggctctttcg agaagcgaac 1020
ctggagcccg gctacccaca gccgctgacc agctatggcc tgggcatccc ctatgaccgc 1080
attgacacgg ccactctggt ggagcccaca ggccacacct tcttcttcca agaggacagg 1140
30 tactggcgct tcaacgagga gacacagcgt ggagaccctg ggtaccccaa gcccatcagt 1200
gtctggcagg ggatccctgc ctcccctaaa ggggccttcc tgagcaatga cgcagcctac 1260
acctacttct acaagggcac caaatactgg aaattcgaca atgagcgcct gcggatggag 1320
cccggctacc ccaagtccat cctgcgggac ttcatgggct gccaggagca cgtggagcca 1380
ggcccccgat ggcccagcgt ggcccggccg cccttcaacc cccacggggg tgcagagccc 1440
35 ggggcgagaca gcgcagagg cgacgtgggg gatggggatg gggacttttg ggccgggggtc 1500
aacaaggaca ggggcagccg cgtggtggtg cagatggagg aggtggcacg gacggtgaac 1560
gtggtgatgg tgctggtgcc actgctgctg ctgctctgcg tcctgggcct cacctacgcg 1620
ctggtgcaga tgcagcgcaa gggcgcgcca cgtgtcctgc tttactgcaa gcgctcgctg 1680
40 caggagtggg tctga 1695

<210> 74
<211> 1824
<212> DNA
<213> Homo sapiens

45

<300>
<302> MT3MMP
<310> D85511

50

<400> 74
atgatcttac tcacattcag cactggaaga cggttggatt tcgtgcatca ttcgggggtg 60
ttttctttgc aaaccttgct ttggatttta tgtgtacac tctgcggaac ggagcagtat 120
55 ttcaatgtgg aggtttggtt acaaaagtac ggctacctc caccgactga cccagatg 180
tcagtgtctg gctctgcaga gaccatgcag tctgacctag ctgccatgca gcagttctat 240
ggcattaaca tgacaggaaa agtggacaga aacacaattg actggatgaa gaagccccga 300
tgcggtgtac ctgaccagac aagaggtagc tccaaatttc atattcgtcg aaagcgatat 360
gcattgacag gacagaaatg gcagcacaag cacatcactt acagtataaa gaacgtaact 420
ccaaaagtga gagaccctga gactcgtaaa gctattcgcc gtgcctttga tgtgtggcag 480
60 aatgtaactc ctctgacatt tgaagaagtt ccctacagtg aattagaaaa tggcaaacgt 540
gatgtggata taaccattat ttttgcattt gggttccatg gggacagctc tccctttgat 600
ggagagggag gatttttggc acatgcctac ttccctggac caggaattgg aggagatacc 660

5 cattttgact cagatgagcc atggacacta ggaaatccta atcatgatgg aaatgactta 720
 tttctttag cagtccatga actgggacat gctctgggat tggagcattc caatgacccc 780
 actgccatca tggctccatt ttaccagtac atggaaacag acaacttcaa actacctaata 840
 gatgatttac agggcatcca gaagatatat ggtccacctg acaagattcc tccacctaca 900
 10 agacctctac cgacagtgcc ccacacccgc tctattcctc cggctgaccc aaggaaaaat 960
 gagaggccaa aacctcctcg gctccaacc ggcagacctt cctatcccgg agccaaaccc 1020
 aacatctgtg atgggaactt taacactcta gctattcttc gtcgtgagat gtttgttttc 1080
 aaggaccagt ggttttggcg agtgagaaac aacagggtga tggatggata cccaatgcaa 1140
 15 attacttact tctggcgggg cttgcctcct agtatcgatg cagtttatga aaatagcgac 1200
 gggaattttg tgttctttaa aggttaacaaa tattgggtgt tcaaggatac aactcttcaa 1260
 cctggttacc ctcatgactt gataaccctt ggaagtggaa ttccccctca tggatttgat 1320
 tcagccattt ggtgggagga cgtcgggaaa acctatttct tcaagggaga cagatattgg 1380
 agatatagtg aagaaatgaa aacaatggac cctggctatc ccaagccaat cacagtctgg 1440
 20 aaaggatccc ctgaatctcc tcaggagga tttgtacaca aagaaaatgg ctttacgtat 1500
 15 ttctacaaag gaaaggagta ttggaaattc aacaaccaga tactcaaggt agaacctgga 1560
 tatccaagat ccattcctcaa ggattttatg ggctgtgatg gaccaacaga cagagtttaa 1620
 gaaggacaca gccaccaga tgatgtagac attgtcatca aactggacaa cacagccagc 1680
 actgtgaaag ccatagctat tgtcattccc tgcattctgg ccttatgcct ccttgatttg 1740
 20 gtttacactg tgttccagtt caagagggaa ggaacacccc gccacatact gtactgtaaa 1800
 cgctctatgc aagagtgggt gtga 1824

<210> 75
 <211> 1818
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> MT4MMP
 30 <310> AB021225

<400> 75
 atggcggcgc gcgcagcccg gggaccggcg ccgcgcgcgc caggggcccg actctcgcgg 60
 35 ctgcccgtgc tgcccgtgcc gctgctgctg ctgctggcgc tggggaccgc cgggggctgc 120
 gccgcgcgcg aaccgcgcgc gcgcgcgcgc gacctcagcc tgggagtgga gtggctaagc 180
 aggttcgggt acctgccccg ggctgacccc acaacagggc agctgcagac gcaagaggag 240
 ctgtctaaag ccattcacag catgcagcag tttgggtggc tggaggccac cggcatcctg 300
 40 gacgaggcca ccctggccct gatgaaaacc ccagctgct cctgcgcaga cctccctgtc 360
 ctgaccagag ctgcagagg acgccaggct ccagccccc ccaagtggaa caagaggaaac 420
 ctgtcgtgga gggtcgggac gttcccacgg gactcaccac tggggcacga cacggtgcgt 480
 gcactcatgt actacgccct caaggtctgg agcgacattg cgccccgtga cttccacgag 540
 gtggcggggc gcaccgccga catccagatc gacttctcca agggcgacca taacgacggc 600
 45 tacccttctc acgcccggcg gcaccgtgac cagccttctc tccccggcca ccaccacacc 660
 gccgggtaca ccacttttaa cgatgacgag gacctggacct tccgctcctc ggatgcccac 720
 gggatggacc tgtttgcagt ggctgtccac gagtttggcc acgccatttg gtttaagccat 780
 gtggccgctg cacactccat catgcggccg tactaccagg gcccggtggg tgaccgctg 840
 cgctacgggc tccccacga ggacaagggt cgcgtctggc agctgtacgg tgtgcgggag 900
 50 tctgtgtctc ccacggcgca gcccgaggag cctcccctgc tgccggagcc cccagacaaac 960
 cggtcacagc ccccgcccag gaaggacgtg ccccacagat gcagcactca ctttgacgcg 1020
 gtggcccaga tccgggggtga agctttcttc ttcaaaggca agtacttctg gcggtgcagc 1080
 cgggaccggc acctggtgtc cctgcagccg gcacagatgc accgcttctg gcggggcctg 1140
 ccgctgcacc tggacagcgt ggacgcccgt tacgagcgca ccagcgacca caagatcgtc 1200
 55 ttctttaaag gagacaggta ctgggtgttc aaggacaata acgtagagga aggatacccc 1260
 cgccccgtct cgcacttcag cctcccgcct ggccggcatc acgctgcctt ctcttgggccc 1320
 cacaatgaca ggactttatt ctttaaggac cagctgtact ggcgctacga tgaccacacg 1380
 aggcacatgg accccggcta ccccgcccag agccccctgt ggaggggtgt cccagcacg 1440
 ctggacgacg ccatgcgctg gtccgacggg gcctcctact tcttccgtgg ccaggagtac 1500
 60 tggaaagtgc tggatggcga gctggagggt gcacccgggt acccacagtc cacggcccgg 1560
 gactggctgg tgtgtggaga ctcacaggcc gatggatctg tggctgcccg cgtggacgcg 1620
 gcagaggggc cccgcgcccc tccaggacaa catgaccaga gccgctcgga ggacgggtac 1680
 gaggtctgct catgcacctc tggggcatcc tctccccggg gggccccagg cccactgtgtg 1740
 gctgccacca tgctgctgct gctgccgcca ctgtcaccag gcgcctctgt gacagcggcc 1800

caggccctga cgctatga

1818

5 <210> 76
 <211> 1938
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <302> MT5MMP
 <310> AB021227

<400> 76
 15 atgccgagga gccggggcgg ccgcgcgcgc cgggggcgc cgcgcgcgc gccgcgcgc 60
 ggccaggccc cgcgctggag ccgctggcgc gtccctgggc ggctgctgct gctgctgctg 120
 cccgcgctct gctgcctccc gggcgccgcg cgggcggcgc cggcgggcgg gggggcaggg 180
 aaccgggcag cgggtggcgg ggcgggtggc cgggcggacg aggcggaggc gcccttcgcc 240
 gggcagaact ggttaaagtc ctatggctat ctgctccct atgactcacg ggcactctgcg 300
 20 ctgcactcag cgaaggcctt gcagtcggca gtctccacta tgcagcagtt ttacgggatc 360
 ccggtcaccc gtgtgttgga tcagacaacg atcgagtga tgaagaaacc ccgatgtggt 420
 gtccctgacg acccccactt aagccgtagg cggagaaaca agcgctatgc cctgactgga 480
 cagaagtga ggcaaaaaca catcacctac agcattcaca actatacccc aaaagtgggt 540
 gagctagaca cgcggaaagc tattcgccag gctttcgatg tgtggcagaa ggtgaccca 600
 ctgacctttg aagaggtgcc ataccatgag atcaaaagtg accggaagga ggcagacatc 660
 25 atgatctttt ttgcttctgg ttccatggc gacagctccc catttgatgg agaaggggga 720
 ttccctggccc atgcctactt ccctggccca gggattggag gagacacca ctttgactcc 780
 gatgagccat ggacgctagg aaacgccaac catgacggga acgacctct cctggtggt 840
 gtgcatgagc tgggccacgc gctgggactg gagcactcca gcgacccag cgccatcatg 900
 30 gcgcccctct accagtacat ggagacgcac aacttcaagc tgccccagga cgatctccag 960
 ggcattccaga agatctatgg acccccagcc gagcctctgg agcccacaag gccactccct 1020
 acactccccg tccgcaggat ccactcacca tcggagagga aacacgagcg ccagcccagg 1080
 ccccctcggc cgcccctcgg ggaccggcca tccacaccag gcaccaaacc caacatctgt 1140
 gacggcaact tcaacacagt ggccctcttc cggggcgaga tgtttgtctt taaggatcgc 1200
 35 tggttctggc gtctgcgcaa taaccgagtg caggagggct accccatgca gatcgagcag 1260
 ttctggaagg gcctgcctgc ccgcatcgac gcagcctatg aaagggcga tgggagattt 1320
 gtcttcttca aaggtgacaa gtattgggtg tttaaggagg tgacggtgga gcctgggtac 1380
 cccacagcc tgggggagct gggcagctgt ttgccccgtg aaggcattga cacagctctg 1440
 cgctgggaac ctgtgggcaa gacctacttt ttcaaaggcg agcggtagtg gcgtacagc 1500
 40 gaggagcggc gggccacgga ccctggctac cctaagccca tcaccgtgtg gaagggcac 1560
 ccacaggctc cccaaggagc cttcatcagc aaggaaggat attacacctt tttctacaag 1620
 ggcgggact actggaagtt tgacaaccag aaactgagcg tggagccagg ctaccgcgc 1680
 aacatcctgc gtgactggat gggctgcaac cagaaggagg tggagcggcg gaaggagcg 1740
 cggtgcgcc aggacgacgt ggacatcatg gtgacctca acgatgtgcc gggctccgtg 1800
 45 aacgccgtgg ccgtggtcat cccctgcac ctgtccctct gcactcgtgt gctggtctac 1860
 accatcttcc agttcaagaa caagacagcg cctcagcctg tcacctacta taagcgcca 1920
 gtccaggaat ggggtgtga 1938

50 <210> 77
 <211> 1689
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55 <300>
 <302> MT6MMP
 <310> AJ27137

<400> 77
 60 atggggctgc ggctccggct tctggcgtgc ctgcttctgc tgetggcacc gccgcgcgc 60
 gccccgaagc cctcggcgca ggacgtgagc ctgggcgtgg actggctgac tgcctatggt 120
 tacctgccgc caccacccc tgcccaggcc cagctgcaga gccctgagaa gttgcgcgat 180
 gccatcaaag tcatgcagag gttcgcgggg ctgccggaga ccggccgcat ggaccaggg 240

5 acagtggcca ccatgcgtaa gccccgctgc tccctgcctg acgtgctggg ggtggcgggg 300
 ctggtcaggg ggcgtcgccg gtacgctctg agcggcagcg tgtggaagaa gcgaacctg 360
 acatggaggg tacgttcctt cccccagagc tcccagctga gccaggagac cgtgcgggtc 420
 ctcattgagct atgccccgat ggccctggggc atggagtcag gcctcacatt tcatgagggtg 480
 gattcccccc agggccagga gcccgacatc ctcatcgact ttgcccgcgc cttccaccag 540
 gacagctacc ccttcgacgg gttggggggc accctagccc atgccttctt ccctggggag 600
 cccccatctt ccggggacac tcactttgac gatgaggaga cctggacttt tgggtcaaaa 660
 gacggcgagg ggaccgacct gtttgccgtg gctgtccatg agtttgggca cgccctgggc 720
 ctggggccact cctcagcccc caactccatt atgaggccct tctaccaggg tccggtgggc 780
 10 gaccctgaca agtaccgcct gtctcaggat gaccgcgatg gcctgcagca actctatggg 840
 aaggcgcccc aaaccccata tgacaagccc acaaggaaac ccctggctcc tccgccccag 900
 cccccggcct cgccacacac cagcccatcc ttcccatcc ctgatcgatg tgagggcaat 960
 tttgacgcca tcgccaacat ccgaggggaa actttcttct tcaaaggccc ctggttcttg 1020
 cgctccagc cctccggaca gctgggtgtc ccgcgacccg cacggctgca ccgcttcttg 1080
 15 gaggggctgc ccgccagggt gaggggtgtg caggccgcct atgctcggca ccgagacggc 1140
 cgaatcctcc tccttagcgg gccccagttc tgggtgttcc aggaccggca gctggagggc 1200
 ggggcgcggc gcctcacgga gctggggctg cccccgggag aggaggtgga cgccgtgttc 1260
 tcgtggccac agaaccggaa gacctactg gtccgcggcc gccagtactg gcgctacgac 1320
 gaggcggcgg cgcccccgga ccccggtac cctcgcgacc tgagcctctg ggaaggcgcg 1380
 20 cccccctccc ctgacgatgt caccgtcagc aacgcagggt acacctactt cttcaagggc 1440
 gcccactact ggcgcttccc caagaacagc atcaagaccg agccggacgc cccccagccc 1500
 atggggccca actggctgga ctgccccgcc ccagctctg gtccccgcgc cccagggccc 1560
 cccaaagcga ccccgctgtc cgaaacctgc gattgtcagt gcgagctcaa ccaggccgca 1620
 25 ggacgttggc ctgctcccat cccgctgctc ctcttgcccc tgctgggtggg ggggtgtagcc 1680
 tcccgtga 1689

30 <210> 78
 <211> 1749
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <300>
 <302> MTMP
 <310> X90925

40 <400> 78
 atgtctccc cccaagacc ctcccgttgt ctctgctcc ccctgctcac gctcggcacc 60
 gcgctgcct ccctcggctc ggcccaaagc agcagcttca gccccgaagc ctgggtacag 120
 caatatggct acctgcctcc cggggaccta cgtacccaca cacagcgctc accccagtca 180
 ctctcagcgg ccatcgctgc catgcagaag ttttacggct tgcaagtaac aggcaaagct 240
 gatgcagaca ccatgaaggc catgaggcgc ccccgatgtg gtgttccaga caagtgtggg 300
 gctgagatca aggccaatgt tcgaaggaag cgctacgcca tccagggtct caaatggcaa 360
 45 cataatgaaa tcactttctg catccagaat tacaccccca aggtgggcga gtatgccaca 420
 tacgaggcca ttcgcaaggc gttccgcgtg tgggagagtg ccacaccact gcgcttccgc 480
 gaggtgcctt atgcctacat ccgtgagggc catgagaagc aggcgcacat catgatcttc 540
 tttgccgagg gcttccatgg cgacagcacg cccttcgatg gtgagggcgg cttcctggcc 600
 catgcctact tcccaggccc caacattgga ggagacaccc actttgactc tgccgagcct 660
 tggactgtca ggaatgagga tctgaatgga aatgacatct tccctgggtggc tgtgcacgag 720
 50 ctggggccatg ccctggggct cgagacctcc agtgacctc cggccatcat ggcacccttt 780
 taccagtggg tggacacgga gaattttgtg ctgcccgatg atgaccgccc gggcatccag 840
 caactttatg ggggtgagtc agggttcccc accaagatgc cccctcaacc caggactacc 900
 tcccggcctt ctgttccctga taaacccaaa aacccacct atggggccaa catctgtgac 960
 gggaaacttg acaccgtggc catgctccga ggggagatgt ttgtcttcaa ggagcgctgg 1020
 55 ttctggcggg tgaggaataa ccaagtgatg gatggatacc caatgcccac tggccagttc 1080
 tggcggggcc tgctgcgctc caatcaacat gcctacgaga ggaaggatgg caaatctcgtc 1140
 ttcttcaaa gagacaagca ttgggtgttt gatgaggcgt ccctggaacc tggctacccc 1200
 aagcacatta aggagctggg ccgagggctg cctaccgaca agattgatgc tgctctcttc 1260
 tggatgcccc atggaaagac ctacttcttc cgtggaaaca agtactaccg ttccaacgaa 1320
 60 gagctcaggg cagtggtatg cgagtacccc aagaacatca agtctggga agggatccct 1380
 gagtctccca gagggtcatt catgaggtct tcacttactt ctacaagggg 1440
 aacaaatact ggaaattcaa caaccagaag ctgaaggtag aaccgggcta cccaaggcca 1500

gccctgaggg actggatggg ctgcccacg ggaggccggc cggatgaggg gactgaggag 1560
 gagacggagg tgatcatcat tgagggtggac gaggagggcg gcggggcggt gagcgcggt 1620
 gccgtggtgc tgcccgtgct gctgctgctc ctggtgctgg cgggtggcct tgcagtcttc 1680
 ttcttcagac gccatgggac ccccaggcga ctgctctact gccagcggtc cctgctggac 1740
 5 aaggtctga 1749

<210> 79
 <211> 744
 10 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF1
 15 <310> XM003647

<400> 79
 atggccgagg ccatcgctag cggcttgatc cgccagaagc ggcaggcgcg ggagcagcac 60
 20 tgggaccggc cgtctgccag caggaggcgg agcagcccca gcaagaaccg cgggctctgc 120
 aacggcaacc tgggtggatat cttctccaaa gtgcgcatct tcggcctcaa gaagcgagg 180
 ttgcggcgcc aagatcccca gctcaagggt atagtgaaca ggttatattg caggcaaggc 240
 tactacttgc aaatgcaccc cgatggagct ctcgatggaa ccaaggatga cagcactaat 300
 tctacactct tcaacctcat accagtggga ctacgtgttg ttgccatcca gggagtgaag 360
 25 acagggttgt atatagccat gaatggagaa ggttacctct acccatcaga actttttacc 420
 cctgaatgca agtttaaaga atctgttttt gaaaattatt atgtaatcta ctcacccatg 480
 ttgtacagac aacaggaatc tggtagagcc tgggttttgg gatataataa ggaagggcaa 540
 gctatgaaag ggaacagagt aaagaaaacc aaaccagcag ctcatcttct acccaagcca 600
 ttggaagtgt ccatgtaccg agaaccatct ttgcatgatg ttggggaaac ggtcccgaag 660
 30 cctgggggtga cgccaagtaa aagcacaagt gcgtctgcaa taatgaatgg aggcaaacca 720
 gtcaacaaga gtaagacaac atag 744

<210> 80
 <211> 468
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF2
 40 <310> NM002006

<400> 80
 atggcagccg ggagcatcac cagcgtgccc gccttgcccg aggatggcgg cagcggcgcc 60
 45 ttcccgcccg gccacttcaa ggacccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc 120
 ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg agaagagcga ccctcacatc 180
 aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaag 240
 cgttacctgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaagtgtg tacggatgag 300
 tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata aactacaata cttaccggtc aaggaaatac 360
 50 accagttggg atgtggcact gaaacgaact gggcagtata aacttggatc caaaacagga 420
 cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga 468

<210> 81
 <211> 756
 55 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF23
 60 <310> NM020638

<400> 81

atgttggggg cccgcctcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc 60
 gtccctcagag cctatcccaa tgccctccca ctgctcggct ccagctgggg tggcctgac 120
 cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccat 180
 gtggatggcg caccatca gaccatctac agtgccctga tgatcagatc agaggatgct 240
 5 ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga ttccagaggc 300
 aacatttttg gatcacacta tttcgacccg gagaactgca gggtccaaca ccagacgctg 360
 gaaaacgggt acgacgtcta ccactctcct cagtatcact tcctggtcag tctgggcccgg 420
 gcgaagagag ccttcctgcc aggcataaac ccaccccggt actcccagtt cctgtcccgg 480
 aggaacgaga tccccctaat tcacttcaac acccccatac cacggcggca caccggagc 540
 10 gccgaggacg actcggagcg ggacccccctg aacgtgctga agccccgggc ccggatgacc 600
 ccggccccgg cctcctgttc acaggagctc ccgagcgccg aggacaacag cccgatggcc 660
 agtgacccat taggggtggg cagggggcgt cgagtgaaca cgcacgctgg gggaaacgggc 720
 ccggaaggct gccgcccctt cgccaagttc atctag 756

<210> 82
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF3
 <310> NM005247

<400> 82
 atgggcctaa tctggctgct actgctcagc ctgctggagc ccgctggcc cgcagcgggc 60
 cctggggcgc ggttgccggc cgatgcgggc ggccgtggcg gcgtctacga gcaccttggc 120
 ggggcgcccc ggccgcccga gctctactgc gccacgaagt accacctcca gctgcaccg 180
 agcggcccg tcaacggcag cctggagaac agcgcctaca gtattttgga gataacggca 240
 30 gtggaggtgg gcattgtggc catcaggggt ctcttctccg ggccgtacct ggccatgaac 300
 aagaggggac gactctatgc ttcggagcac tacagcgccg agtgccagtt tgtggagcgg 360
 atccacgagc tgggtataa tacgtatgcc tcccggctgt accggacggt gtctagtacg 420
 cctggggccc gccggcagcc cagcgccgag agactgtggg acgtgtctgt gaacggcaag 480
 ggccggcccc gcaggggctt caagaccgcy cgcacacaga agtcctccct gttcctgccc 540
 35 cgctgtctgg accacaggga ccacgagatg gtgcggcagc tacagagtgg gctgcccaga 600
 ccccttggtg agggggtcca gcccgcagcg cggcggcaga agcagagccc ggataacctg 660
 gagccctctc acgttcaggc ttcgagactg ggctcccagc tggaggccag tgcgcactag 720

<210> 83
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF5
 <310> NM004464

<400> 83
 atgagcttgt ccttcctcct cctcctcttc ttcagccacc tgatcctcag cgcctgggct 60
 cacggggaga agcgtctcgc ccccaaaggg caaccgggac ccgctgccac tgataggaa 120
 cctataggct ccagcagcag acagagcagc agtagcgcta tgtcttctc ttctgcctcc 180
 tcctcccccg cagcttctct gggcagccaa ggaagtggct tggagcagag cagtttccag 240
 55 tggagcccc cggggcgccg gaccggcagc ctctactgca gagtgggcat cggtttccat 300
 ctgcagatct acccgatgg caaagtcaat ggatcccacg aagccaatat gttaagtgtt 360
 ttggaaatat ttgctgtgtc tcaggggatt gttagaatac gaggagtttt cagcaacaaa 420
 ttttttagcga tgtcaaaaaa aggaaaactc catgcaagtg ccaagtccac agatgactgc 480
 aagttcaggg agcgttttca agaaaatagc tataatacct atgcctcagc aatacataga 540
 actgaaaaaa cagggcgggg gtggtatgtt gccctgaata aaagaggaaa agccaaacga 600
 60 ggggtgcagc cccgggttaa accccagcat atctctaccc attttcttcc aagattcaag 660
 cagtcggagc agccagaact ttctttcacg gttactgttc ctgaaaagaa aaatccacct 720
 agccctatca agtcaaagat tcccccttct gcacctcgga aaaataccaa ctcagtga 780

tacagactca agtttcgctt tggataa

807

5 <210> 84
 <211> 649
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <302> FGF8
 <310> NM006119

<400> 84
 15 atgggcagcc cccgctccgc gctgagctgc ctgctgttgc acttgctggt cctctgcctc 60
 caagcccagg taactgttca gtccctcacct aattttacac agcatgtgag ggagcagagc 120
 ctggtgacgg atcagctcag ccgccgcctc atccggacct accaactcta cagccgcacc 180
 agcgggaagc acgtgcaggc cctggccaac aagcgcatca acgccatggc agaggacggc 240
 gaccccttcg caaagctcat cgtggagacg gacacctttg gaagcagagt tcgagtccga 300
 20 ggagccgaga cgggcctcta catctgcatg aacaagaagg ggaagctgat cgccaagagc 360
 aacggcaaaag gcaaggactg cgtcttcacg gagattgtgc tggagaacaa ctacacagcg 420
 ctgcagaatg ccaagtacga gggctggtac atggccttca cccgcaaggg ccggccccgc 480
 aagggctcca agacgcggca gcaccagcgt gaggtccact tcatgaagcg gctgccccgg 540
 ggccaccaca ccaccgagca gagcctgcgc ttcgagttcc tcaactaccc gcccttcacg 600
 25 cgcagcctgc gcggcagcca gaggacttgg gccccggaac cccgatagg 649

30 <210> 85
 <211> 2466
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <300>
 <302> FGFR2
 <310> NM000141

<400> 85
 40 atggtcagct ggggtcgctt catctgcctg gtcgtggtca ccatggcaac cttgtccctg 60
 gcccgccctt ccttcagttt agttgaggat accacattag agccagaaga gccaccaacc 120
 aaataccaaa tctctcaacc agaagtgtac gtggctgcgc caggggagtc gctagagggtg 180
 cgctgcctgt tgaaagatgc cgcctgcatc agttggacta aggatggggt gcacttggggg 240
 cccaacaata ggacagtgtt tattggggag tacttgcaga taaagggcgc cacgcctaga 300
 gactccggcc tctatgcttg tactgccagt aggactgtag acagtgaaac ttggtacttc 360
 atggtgaatg tcacagatgc catctcatcc ggagatgatg aggatgacac cgatggtgctg 420
 45 gaagattttg tcagtggaga cagtaacaac aagagagcac catactggac caacacagaa 480
 aagatggaaa agcggctcca tgctgtgcct gcggccaaca ctgtcaagtt tcgtgcccc 540
 gccgggggga acccaatgcc aaccatgcgg tggctgaaaa acgggaagga gtttaagcag 600
 gagcatcgca ttggaggcta caaggtacga aaccagcact ggagcctcat tatggaaagt 660
 gtggtcccat ctgacaaggg aaattatacc tgtgtggtgg agaatagaata cgggtccatc 720
 50 aatcacacgt accacctgga tgttggggag cgatcgctc accggcccat cctccaagcc 780
 ggactgcccg caaatgcctc cacagtgggc ggaggagacg tagagtgtgt ctgcaagggt 840
 tacagtgatg cccagcccca catccagtgg atcaagcacg tggaaaagaa cggcagtaaa 900
 tacgggcccc acgggctgcc ctacctcaag gttctcaagg ccgcccgtgt taacaccacg 960
 gacaaagaga ttgaggttct ctatatccgg aatgtaactt ttgaggacgc tggggaatat 1020
 acgtgcttgg cgggtaatto tattgggata tcctttcact ctgcatgggt gacagttctg 1080
 55 ccagcgcctg gaagagaaaa ggagattaca gcttccccag actacctgga gatagccatt 1140
 tactgcatag gggctctctt aatcgctgt atgggtggtaa cagtcacccg gtgcccgaatg 1200
 aagaacacga ccaagaagcc agacttcacg agccagccgg ctgtgcacaa gctgacacaa 1260
 cgtatcccc tgcggagaca ggtaacagtt tcggctgagt ccagctcctc catgaactcc 1320
 aacacccgc tggtgaggat aacaacacgc ctctcttcaa cggcagacac ccccatgctg 1380
 60 gcagggtctt ccgagtatga acttccagag gacccaaaat gggagtttcc aagagataag 1440
 ctgacactgg gcaagccctt gggagaagggt tgctttgggc aagtgggtcat ggcggaagca 1500
 gtgggaattg acaaagacaa gcccaaggag gcggctcaccg tggccgtgaa gatgttgaaa 1560

	gatgatgccca	cagagaaaga	cctttctgat	ctggtgtcag	agatggagat	gatgaagatg	1620
	attgggaaac	acaagaatat	cataaatctt	cttggagcct	gcacacagga	tgggcctctc	1680
	tatgtcatag	ttgagtatgc	ctctaaaggc	aacctccgag	aatacctccg	agcccggagg	1740
	ccacccgga	tggagtactc	ctatgacatt	aaccgtgttc	ctgaggagca	gatgaccttc	1800
5	aaggacttg	tgtcatgcac	ctaccagctg	gccagaggca	tggagtactt	ggcttcccaa	1860
	aaatgtattc	atcgagattt	agcagccaga	aatgttttgg	taacagaaaa	caatgtgatg	1920
	aaaatagcag	actttggact	cgccagagat	atcaacaata	tagactatta	caaaaagacc	1980
	accaatgggc	ggcttccagt	caagtggatg	gctccagaag	ccctgtttga	tagagtatac	2040
	actcatcaga	gtgatgtctg	gtccttcggg	gtgttaatgt	gggagatcct	cactttaggg	2100
10	ggctcgcct	acccagggat	tcccgaggag	gaacttttta	agctgctgaa	ggaaggacac	2160
	agaatggata	agccagccaa	ctgcaccaac	gaactgtaca	tgatgatgag	ggactgttgg	2220
	catgcagtgc	cctcccagag	accaacgttc	aagcagttgg	tagaagactt	ggatcgattt	2280
	ctcactctca	caaccaatga	ggaatacttg	gacctcagcc	aacctctcga	acagtattca	2340
	cctagtacc	ctgacacaag	aagttcttgt	tcttcaggag	atgattctgt	ttttctcca	2400
15	gaccccatgc	cttacgaacc	atgccttcct	cagtatccac	acataaacgg	cagtgttaaa	2460
	acatga						2466
	<210> 86						
20	<211> 2421						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
25	<302> FGFR3						
	<310> NM000142						
	<400> 86						
	atgggcgccc	ctgcctgcgc	cctcgcgctc	tgcgtggcgc	tggccatcgt	ggccggcgcc	60
30	tctcggaggt	ccttggggac	ggagcagcgc	gtcgtggggc	gagcggcaga	agtcccgggc	120
	ccagagcccg	gccagcagga	gcagttggct	tccggcagcg	gggatgctgt	ggagctgagc	180
	tgtccccgc	ccgggggtgg	tcccatgggg	cccactgtct	gggtcaagga	tggcacaggg	240
	ctggtgcct	cctggtgcgt	cctggtgggg	ccccagcggc	tgcaggtgct	gaatgcctcc	300
	cacgaggact	ccggggccta	cagctgccgg	cagcggctca	cgagcgcgt	actgtgccac	360
35	ttcagtgctg	gggtgacaga	cgctccatcc	tccggagatg	acgaagacgg	ggaggacgag	420
	gctgaggaca	caggtgtgga	cacagggggc	ccttactgga	cacggcccga	gcggatggac	480
	aagaagctgc	tggccgtgcc	ggccgcgaac	accgtccgct	tccgctgccc	agccgctggc	540
	aacccactc	cctccatctc	ctggctgaag	aacggcaggg	agttccgcgg	cgagcacccg	600
	attggaggca	tcaagctgcg	gcacgcctgg	tgcagcctgg	tcatggaaag	cgtgggtgcc	660
40	tcggaccgcg	gcaactacac	ctgcgtcgtg	gagaacaagt	ttggcagcat	ccggcagacg	720
	tacacgctgg	acgtgctgga	gcgctccccg	caccggccca	tccctgcaggc	ggggctgccc	780
	gccaaccaga	cggcggtgct	gggcagcgac	gtggagttcc	actgcaagggt	gtacagtgcg	840
	gcacagcccc	acatccagtg	gctcaagcac	gtggaggtga	acggcagcaa	ggtggggccc	900
	gacggcacac	cctacgttac	cgtgctcaag	acggcggggc	ctaaccaccac	cgacaaggag	960
45	ctagagggtt	tctccttgca	caacgtcacc	tttgaggacg	ccggggagta	cacctgcctg	1020
	gcgggcaatt	ctattgggtt	ttctcatcac	tctgcgtggc	tgggtggtgt	gccagccgag	1080
	gaggagctgg	tggaggtgga	cgaggcgggc	agtgtgtatg	caggcatcct	cagctacggg	1140
	gtgggcttct	tccgtttcat	cctgggtggg	gcggctgtga	cgctctgccg	cctgcgcagc	1200
	ccccccaaga	aaggcctggg	ctccccacc	gtgcacaaga	tctcccgttt	cccgtctcaag	1260
50	cgacaggtgt	cctcgagtc	caacgcgtcc	atgagctcca	acacaccact	ggtgcgcac	1320
	gcaaggctgt	cctcagggga	gggccccacg	ctggccaatg	tctccgagct	cgagctgcct	1380
	gccgacccca	aatgggagct	gtctcggggc	cggctgaccc	tgggcaagcc	ccttggggag	1440
	ggctgcttcg	gccaggtggg	catggcggag	gccatcggca	ttgacaagga	ccgggcccgc	1500
	aagcctgtca	ccgtagccgt	gaagatgctg	aaagacgatg	ccactgacaa	ggacctgtcg	1560
55	gacctggtgt	ctgagatgga	gatgatgaag	atgatcggga	aacacaaaaa	catcatcaac	1620
	ctgctggggc	cctgcacgca	gggcggggcc	ctgtacgtgc	tgggtggagta	cgcgcccaag	1680
	ggtaacctgc	gggagtttct	gcggggcgcg	cggcccccg	gcctggacta	ctccttcgac	1740
	acctgcaagc	cgcccagagga	gcagctcacc	ttcaaggacc	tgggtgtcctg	tgcctaccag	1800
	gtggcccggg	gcatggagta	cctggcctcc	cagaagtga	tccacaggga	cctggctgcc	1860
60	cgcaatgtgc	tggtagccga	ggacaacgtg	atgaagatcg	cagacttcgg	gctggcccgg	1920
	gacgtgcaca	acctcgacta	ctacaagaag	acaaccaacg	gccggctgcc	cgtgaagtgg	1980
	atggcgctcg	aggccttggt	tgaccgagtc	tacactcacc	agagtgcgt	ctggctcttt	2040

<300>
<302> ID3
<310> XM001539

5 <400> 88
atgaaggcgc tgagcccggt gcgcggctgc tacgaggcgg tgtgctgcct gtcggaacgc 60
agtctggcca tcgcccgggg ccgagggaag ggcccggcag ctgaggagcc gctgagcttg 120
ctggacgaca tgaaccactg ctactcccg ctcggggaac tggtaaccgg agtcccgaga 180
ggcactcagc ttagccagggt ggaaatccta cagcgcgtca tcgactacat tctcgacctg 240
10 caggtagtcc tggccgagcc agcccctgga cccctgatg gccccacct tcccatccag 300
acagccgagc tcactccgga acttgctcatc tccaacgaca aaaggagctt ttgccactga 360

<210> 89
15 <211> 743
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
20 <302> IGF2
<310> NM000612

<400> 89
25 atgggaatcc caatggggaa gtcgatgctg gtgcttctca ccttcttggc cttcgccctcg 60
tgctgcattg ctgcttaccg cccagtgag accctgtgcg gcggggagct ggtggacacc 120
ctccagttcg tctgtgggga ccgcggttc tacttcagca ggcccgaag ccgtgtgagc 180
cgctgcagcc gtggcatcgt tgaggagtgc tgtttccgca gctgtgacct ggccctcctg 240
gagacgtact gtgctacccc cgccaagtcc gagagggacg tgtcgacccc tccgaccgtg 300
cttccggaca acttccccag ataccctgtg ggcaagttct tccaatatga cacctggaag 360
30 cagtccaccc agcgcctgcg caggggcctg cctgccctcc tgcgtgcccg ccgggggtcac 420
gtgctcgcca aggagctcga ggcggttcagg gaggccaaac gtcaccgtcc cctgattgct 480
ctaccacccc aagaccccgc ccacgggggc gcccccag agatggccag caatcggaag 540
tgagcaaaac tgccgcaagt ctgcagcccc gcgccaccat cctgcagcct cctcctgacc 600
acggacgttt ccatcaggtt ccatcccga aatctctcgg ttccacgtcc ccctggggct 660
35 tctcctgacc cagtccccgt gcccgcctc cccgaaacag gctactctcc tcggccccct 720
ccatcgggct gaggaagcac agc 743

<210> 90
40 <211> 7476
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
45 <302> IGF2R
<310> NM000876

<400> 90
50 atgggggccc cgccgggccc gagccccac ctgggggccc cgcccgccc cgcccgagc 60
cgctctctgc tccgtctgca gctgctgctg ctgctgctg ccccggggtc cagcgaggcc 120
caggccgccc cgctccccga gctgtgcagt tatacatggg aagctgttga taccaaaaat 180
aatgtacttt ataaaatcaa catctgtgga agtgtggata ttgtccagtg cgggcatca 240
agtgtgttt gtatgcacga cttgaagaca cgcacttatc attcagtggtg tgactctggt 300
ttgagaagtg caaccagatc tctcctggaa ttcaacacaa cagttagctg tgaccagcaa 360
55 ggcacaaatc acagagtcca gagcagcatt gccttcctgt gtgggaaaac cctgggaact 420
cctgaatttg taactgcaac agaattgtgt cactactttg agtggaggac cactgcagcc 480
tgcaagaaag acatatTTaa agcaataaag gaggtgccat gctatgtgtt tgatgaagag 540
ttgaggaagc atgatctcaa tcctctgatc aagcttagtg gtgcctactt ggtggatgac 600
tccgatccgg acacttctct attcatcaat gttttagtag acatagacac actacgagac 660
60 ccaggttcac agctgcgggc ctgtcccccc ggcaactgcc cctgcctggt aagaggacac 720
caggcgtttg atgttggcca gcccggggac ggactgaagc tgggtgcgaa ggacaggctt 780
gtcctgagtt acgtgagggg agaggcagga aagctagact tttgtgatgg tcacagccct 840

	gcggtgacta	ttacatttgt	ttgcccgtcg	gagcggagag	agggcaccat	tcccaaactc	900
	acagctaaat	ccaactgccg	ctatgaaatt	gagtggatta	ctgagtatgc	ctgccacaga	960
	gattacctgg	aaagtaaaac	ttgttctctg	agcggcgagc	agcaggatgt	ctccatagac	1020
5	ctcacaccac	ttgcccagag	cggaggttca	tcctatatatt	cagatggaaa	agaatatttg	1080
	ttttatttga	atgtctgtgg	agaaactgaa	atacagttct	gtaataaaaa	acaagctgca	1140
	gtttgccaaag	tgaaaaagag	cgataacctct	caagtcaaaag	cagcaggaag	ataccacaat	1200
	cagaccctcc	gatattcggg	tggagacctc	accttgatat	atthttggagg	tgatgaatgc	1260
	agctcagggg	ttcagcggat	gagcgtcata	aactttgagt	gcaataaaac	cgcaggtaac	1320
10	gatgggaaaag	gaactcctgt	attcacaggg	gaggttgact	gcacctactt	cttcacatgg	1380
	gacacggaat	acgcctgtgt	taaggagaag	gaagacctcc	tctgcggtgc	caccgacggg	1440
	aagaagcgct	atgacctgtc	cgcgctgggt	cgcatgcag	aaccagagca	gaattgggaa	1500
	gctgtggatg	gcagtcagac	ggaaacagag	aagaagcatt	ttttcattaa	tatttgcac	1560
	agagtgtctg	aggaaggcaa	ggcacgaggg	tgtcccaggg	acgcggcagt	gtgtgcagtg	1620
	gataaaaaatg	gaagtaaaaa	tctgggaaaa	tttatttctt	ctcccatgaa	agagaaagga	1680
15	aacattcaac	tctcttattc	agatgggtgat	gatttgtggtc	atggcaagaa	aattaaaact	1740
	aatatcacac	ttgtatgcaa	gccagggtgat	ctggaaagtg	caccagtgtt	gagaacttct	1800
	ggggaaggcg	gttgctttta	tgagttttgag	tggcgcacag	ctgcggctgt	tggtgtgtct	1860
	aagacagaag	gggagaactg	cacggtcttt	gactcccagg	cagggttttc	ttttgactta	1920
20	tcacctctca	caaagaaaaa	tggtgcctat	aaagttgaga	caaagaagta	tgacttttat	1980
	ataaatgtgt	gtggcccggg	gtctgtgagc	ccctgtcagc	cagactcagg	agcctgccag	2040
	gtggcaaaaa	gtgatgagaa	gacttggaac	ttgggtctga	gtaatgcgaa	gctttcatat	2100
	tatgatggga	accgatattg	gaactacaga	ggcggcacac	cctataacaa	tgaaagacac	2160
	acaccgagag	ctacgctcat	cacctttctc	tgtgatcgag	acgcgggagt	gggcttccct	2220
25	gaatatcagg	aagaggataa	ctccacctac	aacttccggg	ggtacaccag	ctatgcctgc	2280
	ccggaggagc	ccctggaatg	cgtagtgacc	gacccctcca	cgctggagca	gtacgacctc	2340
	tccagtctgg	caaaatctga	aggtggcctt	ggaggaaaact	ggtatgccat	ggacaactca	2400
	ggggaacatg	tcacgtggag	gaaatactac	attaacgtgt	gtcggcctct	gaatccagtg	2460
	ccgggctgca	accgatattg	atcggcttgc	cagatgaagt	atgaaaaaga	tcagggtctc	2520
30	ttcactgaag	tggtttccat	cagtaacttg	ggaatggcaa	agaccggccc	ggtgggttag	2580
	gacagcggca	gcctccttct	ggaatactgt	aatgggtcgg	cctgcaccac	cagcgatggc	2640
	agacagacca	catataccac	gaggatccat	ctcgtctgct	ccaggggcag	gctgaacagc	2700
	cacccccatc	tttctctcaa	ctgggagtgt	gtggctcagtt	tcctgtggaa	cacagaggct	2760
	gccttctcca	ttcagacaac	gacggataca	gaccaggctt	gctctataag	ggatcccaac	2820
35	agtggatttg	tgtttaattc	taatccgcta	aacagttcgc	aaggatataa	cgtctctggc	2880
	atttggaaga	tttttatgtt	taatgtctgc	ggcacaatgc	ctgtctgtgg	gaccatcctg	2940
	ggaaaacctg	cttctggctg	tgaggcagaa	acccaaactg	aagagctcaa	gaattggaag	3000
	ccagcaaggc	cagtcggaat	tgagaaaagc	ctccagctgt	ccacagaggg	cttcatcact	3060
	ctgacctaca	aagggcctct	ctctgccaaa	ggtaaccgtg	atgcttttat	cgtccgcttt	3120
40	gtttgcaatg	atgattgtta	ctcagggcc	ctcaaatcc	tgcatcaaga	tatcactctc	3180
	gggcaaggga	tccgaaacac	ttactttgag	tttgaaaaccg	cgttggcctg	tgttccttct	3240
	ccagtggact	gccaaatcac	cgacctggct	ggaaatgagt	acgacctgac	tggcctaagc	3300
	acagttagga	aaccttggac	ggctgttgac	acctctgtcg	atgggagaaa	gaggactttc	3360
	tattttgagc	tttgcaatcc	tctcccttac	attcctggat	gccagggcag	cgcagtgggg	3420
45	tcttgcttag	tgtcagaagg	caatagctgg	aatctgggtg	tggtgcagat	gagtcctcaa	3480
	gccgcggcga	atggatcttt	gagcatcatg	tatgtcaacg	gtgacaagtg	tgggaaccag	3540
	cgcttctcca	ccaggatcac	gtttgagtgt	gctcagatat	cgggctcacc	agcatttcag	3600
	cttcaggatg	gttgtgagta	cgtgtttatc	tggagaactg	tggaaacctg	tcccgttgtc	3660
	agagtggaa	gggacaactg	tgaggtgaaa	gacccaaggc	atggcaactt	gtatgacctg	3720
50	aagcccttgg	gcctcaacga	caccatcgtg	agcgtggcg	aatacactta	ttacttccgg	3780
	gtctgtggga	agctttcttc	agacgtctgc	cccacaagtg	acaagtccaa	ggtgggtctc	3840
	tcagtgcagg	aaaagcggga	accgcaggga	tttcacaaaag	tggcagggtct	cctgactcag	3900
	aagctaactt	atgaaaatgg	cttggttaaaa	atgaacttca	cgggggggga	cacttgccat	3960
	aaggtttatc	agcgctccac	agccatcttc	ttctactgtg	accgcggcac	ccagcggcca	4020
55	gtatttctaa	aggagacttc	agattgttcc	tacttgtttg	agtggcgaa	gcagtatgcc	4080
	tgccaccctt	tcgatctgac	tgaatgttca	ttcaaagatg	gggctggcaa	ctccttcgac	4140
	ctctcgtccc	tgtaaggta	cagtgaaca	tgggaagcca	tcactgggac	gggggacctg	4200
	gagcactacc	tcataaatgt	ctgcaagtct	ctggccccgc	aggctggcac	tgagccgtgc	4260
	cctccagaag	cagccgcgtg	tctgctgggt	ggctccaagc	ccgtgaacct	cggcagggta	4320
60	agggacggag	ctcagtggag	agatggcata	attgtcctga	aatacgttga	tggcgactta	4380
	tgtccagatg	ggattcggaa	aaagtcaacc	accatccgat	tcacctgcag	cgagagccaa	4440
	gtgaactcca	ggcccatggt	catcagcgcc	gtggaggact	gtgagtacac	ctttgcctgg	4500
	cccacagcca	cagcctgtcc	catgaagagc	aacgagcatg	atgactgcca	ggtcaccaac	4560

5 ccaagcacag gacacctgtt tgatctgagc tccttaagtg gcagggcggg attcacagct 4620
 gcttacagcg agaaggggtt gggtttacatg agcatctgtg gggagaatga aaactgccct 4680
 cctggcgtgg gggcctgctt tggacagacc aggattagcg tgggcaaggc caacaagagg 4740
 ctgagatacg tggaccaggt cctgcagctg gtgtacaagg atgggtcccc ttgtccctcc 4800
 10 aaatccggcc tgagctataa gagtgtgatc agtttcgtgt gcaggcctga ggccggggcca 4860
 accaataggc ccatgctcat ctccctggac aagcagacat gcactctctt cttctcctgg 4920
 cacacgccgc tggcctgcga gcaagcgacc gaatgttccg tgaggaatgg aagctctatt 4980
 gttgacttgt ctcccttat tcatcgcaact ggtggttatg aggcttatga tgagagttag 5040
 gatgatgcct ccgataccaa ccctgatttc tacatcaata tttgtcagcc actaaatccc 5100
 15 atgcacgcag tgcctgtcc tgccggagcc gctgtgtgca aagttcctat tgatggtccc 5160
 cccatagata tcggccgggt agcaggacca ccaatactca atccaatagc aaatgagatt 5220
 tacttgaatt ttgaaagcag tactccttgc ttagcggaca agcatttcaa ctacacctcg 5280
 ctcatcgctg ttactgttaa gagaggtgtg agcatgggaa cgcctaagct gttaaggacc 5340
 20 agcaggtgcg actttgtgtt cgaatgggag actcctgtcg tctgtcctga tgaagttagg 5400
 atggatggct gtaccctgac agatgagcag ctccctctaca gcttcaactt gtccagcctt 5460
 tccacgagca cctttaagggt gactcgcgac tcgcgcacct acagcgttgg ggtgtgcacc 5520
 tttgcagtcg ggccagaaca aggaggctgt aaggacggag gactctgtot gctctcaggc 5580
 accaaggggg catccttttg acggctgcaa tcaatgaaac tggattacag gcaccaggat 5640
 25 gaagcggctg ttttaagtta cgtgaatggt gatcggtgcc ctccagaaac cgatgacggc 5700
 gtccctctgt tcttccctct catattcaat gggaagagct acgaggagtg catcatagag 5760
 agcagggcga agctgtggtg tagcacaact ggcgactacg acagagacca cgagtggggc 5820
 ttctgcagac actcaaacag ctaccggaca tccagcatca tatttaagtg tgatgaagat 5880
 gaggacattg ggaggccaca agtcttcagt gaagtgcgtg ggtgtgatgt gacatttgag 5940
 30 tggaaaacaa aagtgtctg ccctccaaag aagttggagt gcaaattcgt ccagaaacac 6000
 aaaacctacg acctgcggtt gctctcctct ctaccgggt cctgggtccc ggtccacaac 6060
 ggagtctcgt actatataaa tctgtgccag aaaatatata aagggccccc gggctgctct 6120
 gaaagggcca gcatttgca aaggaccaca actggtgacg tccaggtcct gggactcgtt 6180
 35 cacacgcaga agctgggtgt cataggtgac aaagttgttg tcacgtactc caaaggttat 6240
 ccgtgtggtg gaaataagac cgcctcctcc gtgatagaat tgacctgtac aaagacgggt 6300
 ggcagacctg cattcaagag gtttgatata gacagctgca cttactactt cagctgggac 6360
 tcccgggctg cctgcgccgt gaagcctcag gaggtgcaga tgggtgaatgg gacctcacc 6420
 aacctataa atggcaagag cttcagcctc ggagatatat attttaagct gttcagagcc 6480
 40 tctggggaca tgaggaccaa tggggacaac tacctgtatg agatccaact ttccctccatc 6540
 acaagctcca gaaacccggc gtgctctgga gccaacatat gccaggtgaa gcccacgat 6600
 cagcacttca gtcggaaagt tggaacctct gacaagacca agtactacct tcaagacggc 6660
 gatctcgatg tcgtgtttgc ctcttcctct aagtgcggaa aggataagac caagtctgtt 6720
 45 tcttccacca tcttcttcca ctgtgacctt ctggtggagg acgggatccc cgagttcagt 6780
 cagagagctg ccgactgcca gtacctctt tcttggtaca cctcagccgt gtgtcctctg 6840
 ggggtgggct ttgacagcga gaatcccggg gacgacgggc agatgcacaa ggggctgtca 6900
 50 gaacggagcc aggcagtcgg cgcggtgctc agcctgctgc tgggtggcgt taagtctgacc 7020
 ctgctggccc tgttgctcta caagaaggag aggagggaaa cagtataag taagctgacc 7080
 acttgctgta ggagaagttc caacgtgtcc taaaaatact caaaggtgaa taaggaagaa 7140
 gagacagatg agaatgaaac agagtggctg atggaagaga tccagctgcc tcctccacgg 7200
 55 cagggaaaagg aagggcagga gaacggccat attaccacca agtcagtga agccctcagc 7260
 tccctgcatg gggatgacca ggacagttag gatgaggttc tgacctccc agaggtgaaa 7320
 gttcactcgg gcaggggagc tggggcagag agctcccacc cagttagaaa cgcacagagc 7380
 aatgcccttc aggagcgtga ggacgatagg gtggggctgg tcaggggtga gaaggcgagg 7440
 60 aaagggaagt ccagctctgc acagcagaag acagttagct ccaccaagct ggtgtccttc 7476
 catgacgaca gcgacgagga cctcttacac atctga

<210> 91

<211> 4104

<212> DNA

55 <213> Homo sapiens

<300>

<302> IGF1R

<310> NM000875

60

<400> 91

atgaagtctg gctccggagg aggggtcccc acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc 60

	gccgcgctct	cgctctggcc	gacgagtggg	gaaatctgcg	ggccaggcat	cgacatccgc	120
	aacgactatc	agcagctgaa	gcgcctggag	aactgcacgg	tgatcgaggg	ctacctccac	180
	atcctgctca	tctccaaggc	cgaggactac	cgcagctacc	gcttccccaa	gctcacggtc	240
5	attaccgagt	acttgctgct	gttccgagtg	gctggcctcg	agagcctcgg	agacctcttc	300
	cccaacctca	cggtcatccg	cggtctggaa	ctcttctaca	actacgccct	ggctcatcttc	360
	gagatgacca	atctcaagga	tattgggctt	tacaacctga	ggaacattac	tcggggggcc	420
	atcaggattg	agaaaaatgc	tgacctctgt	tacctctcca	ctgtggactg	gtccctgata	480
	ctggatgcgg	tgtccaataa	ctacattgtg	gggaataagc	cccccaggga	atgtggggac	540
10	ctgtgtccag	ggaccatgga	ggagaagccg	atgtgtgaga	agaccaccat	caacaatgag	600
	tacaactacc	gctgctggac	cacaaaaccg	tgccagaaaa	tgtgcccaag	cacgtgtggg	660
	aagcgggctg	gcaccgagaa	caatgagtgc	tgccaccccg	agtgcctggg	cagctgcagc	720
	gcgcctgaca	acgacacggc	ctgtgtagct	tgccgccact	actactatgc	cggtgtctgt	780
	gtgcctgcct	gcccgcctca	cacctacagg	tttgagggct	ggcgtctgtg	ggaccgtgac	840
	ttctgcgcca	acatcctcag	cgccgagagc	agcgactccg	aggggtttgt	gatccacgac	900
15	ggcgagtgcg	tcgaggagtg	ccctctgggc	ttcatccgca	acggcagcca	gagcatgtac	960
	tgcattccctt	gtgaaggctc	ttgcccgaag	gtctgtgagg	aagaaaaagaa	aacaaaagacc	1020
	attgattctg	ttacttctgc	tcagatgctc	caaggatgca	ccatcttcaa	gggcaatttg	1080
	ctcattaaca	tcgacgggg	gaataacatt	gcttcagagc	tggaagactt	catggggctc	1140
20	atcgagggtg	tgacgggcta	cgtgaagatc	cgccattctc	atgccttggg	ctccttgttc	1200
	ttcctaataa	accttcgcct	catcctagga	gaggagcagc	tagaagggaa	ttactccttc	1260
	tacgtcctcg	acaaccagaa	cttgccagca	ctgtgggact	gggaccaccg	caacctgacc	1320
	atcaaagcag	ggaaaatgta	ctttgctttc	aatcccaaat	tatgtgtttc	cgaaattttac	1380
	cgcatggagg	aagtgcggg	gactaaagg	cgccaaagca	aaggggacat	aaacaccagg	1440
	aacaacgggg	agagagcctc	ctgtgaaagt	gacgtcctgc	atttcacctc	caccaccacg	1500
25	tcgaagaatc	gcattcatcat	aacctggcac	cggtaaccggc	cccctgacta	cagggatctc	1560
	atcagcttca	ccgtttacta	caaggaagca	ccctttaaga	atgtcacaga	gtatgatggg	1620
	caggatgcct	gcggctccaa	cagctggaac	atgggtggacg	tggaacctcc	gcccacaag	1680
	gacgtggagc	ccggcatctt	actacatggg	ctgaagccct	ggactcagta	cgccgtttac	1740
30	gtcaaggctg	tgaccctcac	catgggtggg	aacgaccata	tcctgtgggg	caagagtggg	1800
	atcttgtaca	ttcgcaccaa	tgcttcagtt	ccttccattc	ccttgagcgt	tctttcagca	1860
	tcgaactcct	cttctcagtt	aatcgtgaag	tggaaccttc	cctctctgcc	caacggcaac	1920
	ctgagttact	acattgtgcg	ctggcagcgg	cagcctcagg	acggctacct	ttaccggcac	1980
	aattactgct	caaagacaa	aatccccatc	aggaagtatg	ccgacggcac	catcgacatt	2040
35	gaggaggtca	cagagaaccc	caagactgag	gtgtgtgggtg	gggagaaagg	gccttgctgc	2100
	gcctgcccc	aaactgaagc	cgagaagcag	gccgagaagg	aggaggtgta	ataccgcaa	2160
	gtctttgaga	atttcttgca	caactccatc	ttcgtgcccc	gacctgaaag	gaagcggaga	2220
	gatgtcatgc	aagtggccaa	caccaccatg	tcagagccaa	gcaggaacac	cacggccgca	2280
	gacacctaca	acatcacgga	cccggaaagc	ctggagacag	agtacctttt	ctttgagagc	2340
40	agagtggata	acaaggagag	aactgtcatt	tctaaccttc	ggcctttcac	attgtaccgc	2400
	atcgatatcc	acagctgcaa	ccacgaggct	gagaagctgg	gctgcagcgc	ctccaacttc	2460
	gtctttgcaa	ggactatgcc	cgcagaagga	gcagatgaca	ttcctggggc	agtgacctgg	2520
	gagccaaagg	ctgaaaactc	catcttttta	aagtggccgg	aacctgagaa	tcccaatgga	2580
	ttgattctaa	tgatgaaat	aaaatacggg	tcacaagttg	aggatcagcg	agaatgtgtg	2640
45	tcagacaggg	aatacaggaa	gtatggagg	accggctaaa	cccggggaac	cccggggaac	2700
	tacacagccc	ggattcaggc	cacatctctc	tctgggaatg	ggctgtggac	agatcctgtg	2760
	ttcttctatg	tcagggccaa	aacaggatat	gaaaacttca	tccatctgat	catcgctctg	2820
	cccgctgctg	tctgtttgat	cgtgggagg	ttgggtgatta	tgctgtacgt	cttccataga	2880
	aagagaaata	acagcaggct	ggggaatgga	gtgctgtatg	cctctgtgaa	cccggagtac	2940
50	ttcagcgctg	ctgatgtgta	cgcttctgat	gagtgaggag	tggtcgggga	gaagatcacc	3000
	atgagccggg	aacttgggca	ggggctgctt	ggggtggctt	atgaaggagt	tgccaagggt	3060
	gtgggtgaaag	atgaacctga	aaccagagtg	gccattaaaa	cagtgaacga	ggccgcaagc	3120
	atgcgtgaga	ggattgagtt	tctcaacgaa	gcttctgtga	tgaaggagtt	caattgtcac	3180
	catgtgggtg	gattgtctgg	tgtgggtgtc	caaggccagc	caacactggg	catcatggaa	3240
55	ctgatgacac	ggggcgatct	caaaaattat	ctccgggtctc	tgaggccaga	aatggagaat	3300
	aatccagctc	tagcacctcc	aagcctgagc	aagatgattc	agatggccgg	agagattgca	3360
	gacggcatgg	catacctcaa	cgccaataag	ttcgtccaca	gagaccttgc	tgcccggaat	3420
	tgcatggtag	ccgaagattt	cacagtcaaa	atcggagatt	ttgggtatgac	gcgagatatc	3480
	tatgagacag	actattaccg	gaaaggagcg	aaagggtctc	tgcccgtgcg	ctggatgtct	3540
60	cctgagtcct	tcaaggatgg	agtcttcacc	acttactcgg	acgtctgggtc	cttcgggggtc	3600
	gtcctctggg	agatcgccac	actggccgag	cagccctacc	agggcttgtc	caacgagcaa	3660
	gtccttcgct	tcgtcatgga	gggcggcctt	ctggacaagc	cagacaactg	tcctgacatg	3720
	ctggtttgaac	tgatgcgcat	gtgctggcag	tataacccca	agatgaggcc	ttccttctctg	3780

5	gagatcatca	gcagcatcaa	agaggagatg	gagcctggct	tccgggaggt	ctccttctac	3840
	tacagcgagg	agaacaagct	gcccagagccg	gaggagctgg	acctggagcc	agagaacatg	3900
	gagagcgctcc	ccctggaccc	ctcggcctcc	tcgtcctccc	tgccactgcc	cgacagacac	3960
	tcaggacaca	aggccgagaa	cggcccccggc	cctgggggtgc	tggtcctccg	cgccagcttc	4020
	gacgagagac	agccttacgc	ccacatgaac	ggggggccgca	agaacgagcg	ggccttgccg	4080
	ctgccccagt	cttcgacctg	ctga				4104
10	<210> 92						
	<211> 726						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<300>						
	<302> PDGFB						
	<310> NM002608						
	<400> 92						
20	atgaatcgct	gctgggcgct	cttcctgtct	ctctgtctgt	acctgcgtct	ggtcagcgcc	60
	gagggggacc	ccattccccg	ggagctttat	gagatgctga	gtgaccactc	gatccgctcc	120
	tttgatgata	tccaacgcct	gctgcacgga	gaccccgag	aggaagatgg	ggccgagttg	180
	gacctgaaca	tgaccgcgtc	ccactctgga	ggcgagctgg	agagcttggc	tcgtggaaga	240
	aggagcctgg	gttccctgac	cattgctgag	ccggccatga	tcgcccagtg	caagacgcgc	300
25	accgaggtgt	tcgagatctc	ccggcgcttc	atagaccgca	ccaacgcgca	cttcctgggtg	360
	tggccgcccct	gtgtggaggt	gcagcgctgc	tccggctgct	gcaacaaccg	caacgtgcag	420
	tgccgccccca	cccaggtgca	gctgcgacct	gtccaggtga	gaaagatcga	gattgtgcgg	480
	aagaagccaa	tctttaagaa	ggccacggtg	acgctggaag	accacctggc	atgcaagtgt	540
	gagacagtgg	cagctgcacg	gcctgtgacc	cgaagcccgg	ggggttccca	ggagcagcga	600
30	gccaaaacgc	cccaaaactcg	ggtgaccatt	cggacggtgc	gagtcgcgcg	gcccccaag	660
	ggcaagcacc	ggaaattcaa	gcacacgcac	gacaagacgg	cactgaagga	gacccttgga	720
	gcctag						726
	<210> 93						
	<211> 1512						
35	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> TGFbetaR1						
40	<310> NM004612						
	<400> 93						
45	atggaggcgg	cggtcgctgc	tccgcgtccc	cggctgctcc	tcctcgctgt	ggcggggggcg	60
	gcggcgggcg	cggcgggcgct	gtccccgggg	gcgacggcgt	tacagtgttt	ctgccacctc	120
	tgtacaaaag	acaattttac	ttgtgtgaca	gatgggctct	gctttgtctc	tgccacagag	180
	accacagaca	aagttataca	caacagcatg	tgtatagctg	aaattgactt	aattcctcga	240
	gataggccgt	ttgtatgtgc	accctcttca	aaaactgggt	ctgtgactac	aacatattgc	300
50	tgcaatcagg	accattgcaa	taaaatagaa	cttccaacta	ctgtaaagtc	atcacctggc	360
	cttggtcctg	tggaactggc	agctgtcatt	gctggaccag	tgtgcttcgt	ctgcatctca	420
	ctcatgttga	tggtctatat	ctgccacaac	cgcactgtca	ttcaccatcg	agtgcgcaat	480
	gaagaggacc	cttcattaga	tcgccccttt	atttcagagg	gtactacgtt	gaaagactta	540
	atztatgata	tgacaacgtc	aggttctggc	tcagggtttac	cattgcttgt	tcagagaaca	600
55	attgcgagaa	ctattgtgtt	acaagaaagc	attggcaaa	gtcgatttgg	agaagtttgg	660
	agagaaagt	ggcggggaga	agaagtgtct	gttaagatat	tctcctctag	agaagaacgt	720
	tcgtgggtcc	gtgaggcaga	gatttatcaa	actgtaatgt	tacgtcatga	aaacatcctg	780
	ggatttatag	cagcagacaa	taaagacaat	ggtacttgga	ctcagctctg	gttggtgtca	840
	gattatcatg	agcatggatc	cctttttgat	tacttaaaca	gatacacagt	tactgtggaa	900
60	ggaatgataa	aacttgctct	gtccacggcg	agcggctctg	cccattcttca	catggagatt	960
	gttggtaccc	aaggaaaagcc	agccattgtct	catagagatt	tgaaatcaaa	gaatatcttg	1020
	gtaagaaga	atggaaacttg	ctgtattgca	gacttaggac	tggcagtaag	acatgattca	1080
	gccacagata	ccattgatata	tgctccaaac	cacagagtgg	gaacaaaaag	gtacatggcc	1140

5	cctgaagttc	tcgatgattc	cataaatatg	aaacattttg	aatccttcaa	acgtgctgac	1200
	atctatgcaa	tgggcttagt	attctctggaa	attgctcgac	gatgttccat	tgggtggaatt	1260
	catgaagatt	accaaactgcc	ttattatgat	cttgtagcct	ctgacccatc	agttgaagaa	1320
	atgagaaaag	ttgtttgtga	acagaagtta	aggccaaata	tcccaaacag	atggcagagc	1380
	tgtgaagcct	tgagagtaat	ggctaaaatt	atgagagaat	gttggtatgc	caatggagca	1440
	gctaggctta	cagcattgcg	gattaagaaa	acattatcgc	aactcagtca	acaggaaggc	1500
	atcaaaatgt	aa					1512
10	<210> 94						
	<211> 4044						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<300>						
	<302> Flk1						
	<310> AF035121						
	<400> 94						
20	atgcagagca	aggtgctgct	ggccgctcgcc	ctgtggctct	gcgtggagac	ccgggcccgc	60
	tctgtgggtt	tgcctagtgt	ttctcttgat	ctgcccaggc	tcagcataca	aaaagacata	120
	cttacaatta	aggctaatac	aactcttcaa	attacttgca	ggggacagag	ggacttggac	180
	tggctttggc	ccaataatca	gagtggcagt	gagcaaaggg	tggaggtgac	tgagtgcagc	240
25	gatggcctct	tctgtaagac	actcacaatt	ccaaaagtga	tcggaaatga	cactggagcc	300
	tacaagtgtc	tctaccggga	aactgacttg	gcctcgggtca	tttatgtcta	tgttcaagat	360
	tacagatctc	catttattgc	ttctgttagt	gaccaacatg	gagtcgtgta	cattactgag	420
	aacaaaaaca	aaactgtggt	gattccatgt	ctcgggtcca	tttcaaactc	caacgtgtca	480
30	ctttgtgcaa	gatacccaga	aaagagattt	gttcctgatg	gtaacagaat	ttcctgggac	540
	agcaagaagg	gctttactat	tcccagctac	atgatcagct	atgctggcat	ggctcttctgt	600
	gaagcaaaaa	ttaatgatga	aagttaccag	tctattatgt	acatagttgt	cgttgtaggg	660
	tataggattt	atgatgtggt	tctgagtcgg	tctcatggaa	ttgaactatc	tgttggagaa	720
35	aagctttgtc	ttaaattgtac	agcaagaact	gaactaaatg	tggggattga	cttcaactgg	780
	gaataccctt	cttcgaagca	tcagcataag	aaacttgtaa	accgagacct	aaaaaccag	840
	tctgggagtg	agatgaagaa	atttttgagc	accttaacta	tagatgggtg	aaccggaggt	900
	gaccaaggat	tgtacacctg	tgcagcatcc	agtgggctga	tgaccaagaa	gaacagcaca	960
40	tttgtcaggg	tccatgaaaa	accttttgtt	gcttttggaa	gtggcatgga	atctctggtg	1020
	gaagccacgg	tgggggagcg	tgtcagaatc	cctgcgaagt	accttgggtta	cccaccccca	1080
	gaaataaaat	gggtataaaaa	tggaaatccc	cttgagtcca	atcacacaat	taaagcgggg	1140
	catgtactga	cgattatgga	agtgagtgaa	agagacacag	gaaattacac	tgtcatcctt	1200
45	accaatccca	tttcaaagga	gaagcagagc	catgtggtct	ctctggttgt	gtatgtccca	1260
	ccccagattg	gtgagaaatc	tctaattctct	cctgtggatt	cctaccagta	cggcaccact	1320
	caaacgctga	catgtacggg	ctatgccatt	cctccccgcg	atcacatcca	ctggtattgg	1380
	cagttggagg	aagagtgcgc	caacgagccc	agccaagctg	tctcagtgac	aaaccatac	1440
50	ccttgtgaag	aatggagaag	tgtggaggac	ttccaggag	gaaataaaat	tgaagttaat	1500
	aaaaatcaat	ttgtctctaat	tgaaggaaaa	aacaaaactg	taagtaccct	tgttatccaa	1560
	gcggaatg	tgtcagcttt	gtacaaatgt	gaagcgggtca	acaaagtcgg	gagaggagag	1620
	agggtgatct	ccttccacgt	gaccaggggt	cctgaaatta	ctttgcaacc	tgacatgcag	1680
55	cccactgagc	aggagagcgt	gtctttgtgg	tgcactgcag	acagatctac	gtttgagaac	1740
	ctcacatggt	acaagcttgg	cccacagcct	ctgccaatcc	atgtgggaga	gttgcccaca	1800
	cctgtttgca	agaacttgga	tactctttgg	aaattgaatg	ccaccatggt	ctctaatagc	1860
	acaaatgaca	ttttgatcat	ggagcttaag	aatgcatcct	tgcaggacca	aggagactat	1920
60	gtctgccttg	ctcaagacag	gaagaccaag	aaaagacatt	gcgtggctcag	gcagctcaca	1980
	gtcctagagc	gtgtggcacc	cacgatcaca	ggaaacctgg	agaatcagac	gacaagtatt	2040
	ggggaaagca	tcgaagtctc	atgcacggca	tctgggaatc	cccctccaca	gatcatgtgg	2100
	tttaaagata	atgagaccct	tgtagaagac	tcaggcattg	tattgaagga	tgggaaccgg	2160
65	aacctcacta	tccgcagagt	gaggaaggag	gacgaaggcc	tctacacctg	ccaggcatcg	2220
	agtgttcttg	gctgtgcaaa	agtggaggca	tttttcataa	tagaagggtgc	ccaggaaaag	2280
	acgaacttgg	aaatcattat	tctagttagc	acggcgggtga	ttgccatggt	cttctggcta	2340
	cttcttgtca	tcatoctacg	gaccgttaag	cgggccaatg	gaggggaact	gaagacaggg	2400
70	tacttgtcca	tcgtcatgga	tccagatgaa	ctggccattgg	atgaacattg	tgaacagctg	2460
	ccttatgatg	ccagcaaatg	ggaattcccc	agagaccggc	tgaagctagg	taagcctctt	2520
	ggcctggtg	cctttggcca	agtgattgaa	gcagatgcct	ttggaattga	caagacagca	2580

5 acttgacagga cagtagcagt caaaatgttg aaagaaggag caacacacag tgagcatcga 2640
 gctctcatgt ctgaactcaa gatcctcatt catattgggtc accatctcaa tgtgggtcaac 2700
 cttctaggtg cctgtaccaa gccaggaggg ccactcatgg tgattgtgga attctgcaaa 2760
 tttggaaaacc tgtccactta cctgaggagc aagagaaatg aatttgtccc ctacaagacc 2820
 aaaggggcac gattccgtca agggaaagac tacgttggag caatccctgt ggatctgaaa 2880
 cggcgcttgg acagcatcac cagtagccag agctcagcca gctctggatt tgtggaggag 2940
 aagtccctca gtgatgtaga agaagaggaa gctcctgaag atctgtataa ggacttctctg 3000
 acctgggagc atctcatctg ttacagcttc caagtggcta agggcatgga gttcttggca 3060
 tcgcgaaagt gtatccacag ggacctggcg gcacgaaata tcctcttatc ggagaagaac 3120
 10 gtgggttaaaa tctgtgactt tggcttggcc cgggatattt ataaagatcc agattatgtc 3180
 agaaaaggag atgctcgcct ccttttgaaa tggatggccc cagaaacaat ttttgacaga 3240
 gtgtacacaa tccagagtga cgtctggtct tttggtgttt tgctgtggga aatattttcc 3300
 ttaggtgctt ctccatattc tggggtaaa attgatgaag aattttgtag gcgattgaaa 3360
 gaaggaaacta gaatgagggc ccttgattat actacaccag aaatgtacca gaccatgctg 3420
 15 gactgctggc acggggagcc cagtcagaga cccacgtttt cagagtgtgt ggaacatttg 3480
 ggaaatctct tgcaagctaa tgtcagcag gatggcaaa actacattgt tcttccgaaa 3540
 tcagagactt tgagcatgga agaggattct ggactctctc tgcctacctc acctgtttcc 3600
 tgtatggagg aggaggaagt atgtgacccc aaattccatt atgacaacac agcaggaatc 3660
 agtcagtatc tgcagaacag taagcgaaag agccggcctg tgagtgtaaa aacatttgaa 3720
 20 gatatcccg tagaagaacc agaagtaaaa gtaatcccag atgacaacca gacggacagt 3780
 ggtatgggtt ttgcctcaga agagtgtgaa actttggaag acagaacca attatctcca 3840
 tcttttgggtg gaatgggtgcc cagcaaaagc agggagtctg tggcatctga aggtcctcaa 3900
 cagacaagcg gctaccagtc cggatatcac tccgatgaca cagacaccac cgtgtactcc 3960
 agtgaggaag cagaactttt aaagctgata gagattggag tgcaaaccgg tagcacagcc 4020
 25 cagattctcc agcctgactc gggg 4044

<210> 95
 <211> 4017
 30 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> Flt1
 35 <310> AF063657

<400> 95
 atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgtctctc 60
 40 acaggatcta gttcagggtc aaaattaaaa gatcctgaac tgagttttaa aggcaccag 120
 cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa 180
 tgggtctttgc ctgaaatggg tagtaaggaa agcgaaaggc tgagcataac taaatctgcc 240
 tgtggaagaa atggcaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac 300
 cacactggct tctacagctg caaatatcta gctgtacctc ctcaaagaa gaaggaaaca 360
 45 gaatctgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctctcgtaga gatgtacagt 420
 gaaatccccg aaattataca catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgccgggtt 480
 acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttccac ttgacacttt gatccctgat 540
 ggaaaacgca taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaagtc aacgtacaaa 600
 gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat 660
 50 ctcacacatc gacaaaacca tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgcccagtc 720
 aaattactta gaggccatac tcttgtctct aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg 780
 agagttcaaa tgacctggag ttacctgat gaaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga 840
 cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa 900
 atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgtcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa 960
 55 tctgttaaca cctcagtgca tatatatgat aaagcattca tcaactgtga acatcgaaaa 1020
 cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggctctacc ggctctctat gaaagtgaag 1080
 gcatttccct cgccggaagt tgtatgggta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct 1140
 gctcgctatt tgactcgtgg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca 1200
 gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaatg tgtttaaaaa cctcactgcc 1260
 60 actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcatc gtttccagac 1320
 ccggctctct acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggatccct 1380
 caacctacaa tcaagtgggt ctggcaccct tgtaaccata atcattccga agcaagggtg 1440
 gacttttgtt ccaataatga agagtccctt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac 1500

	agaattgaga	gcatacactca	gcgcacatggca	ataatagaag	gaaagaataa	gatgggctagc	1560
	accttggttg	tggtgactc	tagaatttct	ggaatctaca	tttgcatagc	ttccaataaa	1620
	gttgggactg	tggaagaaa	cataagcttt	tatatcacag	atgtgccaaa	tgggtttcat	1680
	gttaacttgg	aaaaaatgcc	gacggaagga	gaggacctga	aactgtcttg	cacagttaac	1740
5	aagtctttat	acagagacgt	tacttggatt	ttactgcgga	cagttaataa	cagaacaatg	1800
	cactacagta	ttagcaagca	aaaaatggcc	atcactaagg	agcactccat	cactcttaat	1860
	cttaccatca	tgaatgtttc	cctgcaagat	tcaggcacct	atgcctgcag	agccaggaat	1920
	gtatacacag	gggaagaaat	cctccagaag	aaagaaatta	caatcagaga	tcaggaagca	1980
	ccatacctcc	tgcgaaacct	cagtgatcac	acagtggcca	tcagcagttc	caccacttta	2040
10	gactgtcatg	ctaattggtgt	ccccgagcct	cagatcactt	ggtttaaaaa	caaccacaaa	2100
	atacaacaag	agcctggaat	tatttttagga	ccaggaagca	gcacgctgtt	tattgaaaga	2160
	gtcacagaag	aggatgaagg	tgtctatcac	tgcaaaagcca	ccaaccagaa	gggctctgtg	2220
	gaaagtccag	catacctcac	tgttcaagga	acctcggaca	agtctaattct	ggagctgac	2280
	actctaactat	gcacctgtgt	ggctgcgact	ctcttctggc	tcctattaac	cctctttatc	2340
15	cgaaaaatga	aaaggtcttc	ttctgaaata	aagactgact	acctatcaat	tataatggac	2400
	ccagatgaag	ttcctttgga	tgagcagtg	gagcggctcc	cttatgatgc	cagcaagtgg	2460
	gaagtttccc	gggagagact	taaactgggc	aaatcacttg	gaagaggggc	ttttggaaaa	2520
	gtggttcaag	catcagcatt	tggtcattaag	aaatcaccta	cgtgccggac	tgtggctgtg	2580
	aaaatgctga	aagagggggc	cacggccagc	gagtacaaag	ctctgatgac	tgagctaaaa	2640
20	atcttgaccc	acattggcca	ccatctgaac	gtggttaacc	tgctgggagc	ctgcaccaag	2700
	caaggagggc	ctctgatggt	gattgttgaa	tactgcaaat	atggaaatct	ctccaactac	2760
	ctcaagagca	aactgtgact	atTTTTTctc	aacaaggatg	cagcactaca	catggagcct	2820
	aagaaagaaa	aaatggagcc	aggcctggaa	caaggcaaga	aaccaagact	agatagctgt	2880
	accagcagcg	aaagctttgc	gagctccggc	tttcaggaag	ataaaaagtct	gagtgatgtt	2940
25	gaggaagagg	aggattctga	cggtttctac	aaggagccca	tcactatgga	agatctgatt	3000
	tcttacagtt	ttcaagtggc	cagaggcatg	gagttcctgt	cttcagaaa	gtgcattcat	3060
	cgggacctgg	cgcgagaaa	cattctttta	tctgagaaca	acgtggtgaa	gatttgtgat	3120
	tttggccttg	cccggatat	ttataagaac	cccgattatg	tgagaaaagg	agatactcga	3180
	cttctcttga	aatggatggc	tcctgaatct	atctttgaca	aaatctacag	caccaagagc	3240
30	gacgtgtggt	cttacggagt	attgctgtgg	gaaatcttct	ccttaggtgg	gtctccatc	3300
	ccaggagtac	aaatggatga	ggacttttgc	agtgcctga	gggaaggcat	gaggatgaga	3360
	gctcctgagt	actctactcc	tgaaatctat	cagatcatgc	tggaactgctg	gcacagagac	3420
	ccaaaagaaa	ggccaagatt	tgacagaactt	gtggaaaaac	taggtgattt	gcttcaagca	3480
	aatgtacaac	aggatggtaa	agactacatc	ccaatcaatg	ccatactgac	aggaaatagt	3540
35	gggtttacat	actcaactcc	tgcccttctc	gaggacttct	tcaaggaaaag	tatttcagct	3600
	ccgaagttta	attcaggaag	ctctgatgat	gtcagatatg	taaagtcttt	caagttcatg	3660
	agcctggaaa	gaatcaaaaac	ctttgaagaa	cttttaccga	atgccacctc	catgtttgat	3720
	gactaccagg	gcgacagcag	cactctgttg	gcctctccca	tgctgaagcg	cttcacctgg	3780
	actgacagca	aaccacaaggc	ctcgctcaag	attgacttga	gagtaaccag	taaaagtaag	3840
40	gagtcggggc	tgtctgatgt	cagcagggcc	agttctctgc	attccagctg	tgggcacgtc	3900
	agcgaaggca	agcgcaggtt	caoctacgac	cacgctgagc	tggaaaggaa	aatcgcgtgc	3960
	tgctccccgc	ccccagacta	caactcgggt	gtcctgtact	ccacccacc	catctag	4017
45	<210> 96						
	<211> 3897						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
50	<300>						
	<302> Flt4						
	<310> XM003852						
	<400> 96						
55	atgcagcggg	gcgcgcgcgt	gtgcctgcga	ctgtggctct	gcctgggact	cctggacggc	60
	ctgggtgagt	gctactccat	gaccccccg	accttgaaca	tcacggagga	gtcacagtc	120
	atcgacaccg	gtgacagcct	gtccatctcc	tgacggggac	agcaccctcc	cgagtgggtc	180
	tggccaggag	ctcaggaggc	gccagccacc	ggagacaagg	acagcgagga	cacgggggtg	240
	gtgcgagact	gcgagggcac	agacgccagg	ccctactgca	aggtgttgct	gctgcacgag	300
60	gtacatgcc	acgacacagg	cagctacgtc	tgctactaca	agtacatcaa	ggcacgcatc	360
	gagggcacca	cggccgcccag	ctcctacgtg	ttcgtgagag	actttgagca	gccattcatc	420
	aacaagcctg	acacgctctt	ggccaacagg	aaggacgcca	tgtgggtgcc	ctgtctgggtg	480

	tccatccccg	gcctcaatgt	cacgctgcgc	tcgcaaagct	cgggtgctgtg	gccagacggg	540
	caggaggtgg	tgtgggatga	ccggcggggc	atgctcgtgt	ccacgccact	gctgcacgat	600
	gccctgtacc	tgacgtgcga	gaccacctgg	ggagaccagg	acttcctttc	caaccccttc	660
5	tggtgtcaca	tcacaggcaa	cgagctctat	gacatccagc	tgttgcccag	gaagtgcgtg	720
	gagctgctgg	taggggagaa	gctggtcctg	aactgcaccg	tgtgggctga	gtttaactca	780
	ggtgtcacct	ttgactggga	ctaccagggg	aagcaggcag	agcggggtaa	gtgggtgccc	840
	gagcgacgct	cccagcagac	ccacacagaa	ctctccagca	tcctgacat	ccacaacgtc	900
	agccagcacg	acctgggctc	gtatgtgtgc	aaggccaaca	acggcatcca	gcgatttcgg	960
	gagagcaccg	aggtcattgt	gcatgaaaat	cccttcatca	gcgtcgagt	gctcaaaggga	1020
10	cccatcctgg	aggccacggc	aggagacgag	ctgggtgaagc	tgcccgtgaa	gctggcagcg	1080
	taccccccg	ccgagttcca	gtggtacaag	gatggaaagg	cactgtccgg	gcgccacagt	1140
	ccacatgccc	tggtgctcaa	ggaggtgaca	gaggccagca	caggcaccta	caccctcgcc	1200
	ctgtggaact	ccgctgctgg	cctgaggcgc	aacatcagcc	tggagctggt	ggtgaatgtg	1260
	ccccccaga	tacatgagaa	ggaggcctcc	tccccagca	tctactcgcg	tcacagccgc	1320
15	caggccctca	cctgcacggc	ctacgggggtg	cccctgcctc	tcagcatcca	gtggcactgg	1380
	cgccctggga	caccctgcaa	gatgtttgcc	cagctagtc	tccggcggcg	gcagcagcaa	1440
	gacctcatgc	cacagtgcgg	tgactggagg	gcggtgaccg	cgcaggatgc	cgtgaacccc	1500
	atcgagagcc	tggacacctg	gaccgagttt	gtggagggaa	agaataagac	tgtgagcaag	1560
	ctggtgatcc	agaatgcaa	cgtgtctgcc	atgtacaagt	gtgtggtctc	caacaagggtg	1620
20	ggccaggatg	agcggctcat	ctacttctat	gtgaccacca	tccccgacgg	cttcaccatc	1680
	gaatccaagc	atccgagga	gctactagag	ggccagccgg	tgctcctgag	ctgccaaagg	1740
	gacagctaca	agtacgagca	tctgcgctgg	taccgcctca	acctgtccac	gctgcacgat	1800
	gcgcacggga	acccgcttct	gctcgactgc	aagaacgtgc	atctgttcgc	cacccctctg	1860
25	gccgccagcc	tggaggaggt	ggcacctggg	gcgcgccacg	ccacgctcag	cctgagtatc	1920
	ccccgcgtcg	cgcccgagca	cgaggggccac	tatgtgtgcg	aagtgcgaaga	ccggcgagc	1980
	catgacaagc	actgccacaa	gaagtacctg	tcgggtgcagg	ccctggaagg	ccctcggtc	2040
	acgcagaact	tgaccgacct	cctggtgaac	gtgagcgact	cgctggagat	gcagtgtctg	2100
	gtggccggag	cgacgcgcgc	cagcatcgtg	tggtacaaag	acgagaggct	gctggaggaa	2160
30	aagtctggag	tcgacttggc	ggactccaac	cagaagctga	gcatccagcg	cgtgcgcgag	2220
	gaggatgcgg	gacgctatct	gtgcagcgtg	tgcaacgccca	agggtgcgt	caactcctcc	2280
	gccagcgtgg	ccgtggaagg	ctccgaggat	aagggcagca	tggagatcgt	gatccttgtc	2340
	ggtaccggcg	tcacgctgt	cttcttctgg	gtcctcctcc	tcctcatctt	ctgtaacatg	2400
	aggaggccgg	cccagcgaga	catcaagacg	ggctacctgt	ccatcatcat	ggaccccggg	2460
35	gagggtgcctc	tggaggagca	atgcgaatac	ctgtcctacg	atgccagcca	gtgggaattc	2520
	ccccgagagc	ggctgcacct	ggggagagtg	ctcggctacg	gcgccttcgg	gaagggtggtg	2580
	gaagcctccg	ctttcggcat	ccacaagggc	agcagctgtg	acaccgtggc	cgtgaaaatg	2640
	ctgaaagagg	gcgccacggc	cagcgagcag	cgcgcgctga	tgctcgagct	caagatcctc	2700
	attcacatcg	gcaaccacct	caacgtggtc	aacctcctcg	gggcgtgcac	caagccgcag	2760
	ggccccctca	tggtgatcgt	ggagttctgc	aagtacggca	acctctccaa	cttcctgcgc	2820
40	gccaagcggg	acgccttcag	cccctgcgcg	gagaagtctc	ccgagcagcg	cggacgcttc	2880
	cgcgccatgg	tggagctcgc	caggctggat	cggaggcggc	cggggagcag	cgacagggtc	2940
	ctcttcgcgc	ggttctcgaa	gaccgagggc	ggagcgaggc	gggcttctcc	agaccaagaa	3000
	gctgaggacc	tgtggctgag	cccgtgacc	atggaagatc	ttgtctgcta	cagcttccag	3060
45	gtggccagag	ggatggagtt	cctggcttcc	cgaaagtgca	tcacagaga	cctggctgct	3120
	cggaaacattc	tgctgtcgga	aagcgacgtg	gtgaagatct	gtgactttgg	ccttgcccg	3180
	gacatctaca	aagaccccg	ctacgtccgc	aaggggcagt	cccggctgcc	cctgaagtgg	3240
	atggcccttg	aaagcatott	cgacaagggtg	tacaccacgc	agagtgcgt	gtggtccttt	3300
	gggggtgcttc	tctgggagat	cttctctctg	ggggcctccc	cgtaccctgg	ggtgcagatc	3360
	aatgaggagt	tctgccagcg	gctgagagac	ggcacaagga	tgagggcccc	ggagctggcc	3420
50	actcccgcca	tacgccgat	catgctgaac	tgctgggtccg	gagaccccaa	ggcgagacct	3480
	gcattctcgg	agctggtgga	gatcctgggg	gacctgctcc	agggcagggg	cctgcaagag	3540
	gaagaggagg	tctgcatggc	cccgcgcagc	tctcagagct	cagaagaggg	cagcttctcg	3600
	cagggtgtcca	ccatggccct	acacatcgcc	caggctgacg	ctgaggacag	cccgcgaagc	3660
55	ctgcagcgcc	acagcctggc	cgccaggtat	tacaactggg	tgctcctttc	cgggtgcctg	3720
	gccagagggg	ctgagacccg	tggttctcc	aggatgaaga	catttgagga	attccccatg	3780
	accccaacga	cctacaaagg	ctctgtggac	aaccagacag	acagtgggat	ggtgctggcc	3840
	tcggaggagt	ttgagcagat	agagagcagg	catagacaag	aaagcggctt	caggtag	3897
60	<210>	97					
	<211>	4071					
	<212>	DNA					

<213> Homo sapiens

<300>

<302> KDR

5 <310> AF063658

<400> 97

	atggagagca	aggtgctgct	ggccgtcgcc	ctgtggctct	gcgtggagac	ccggggccgcc	60
	tctgtgggtt	tgccctagtgt	ttctcttgat	ctgcccaggc	tcagcataca	aaaagacata	120
10	cttacaatta	aggctaatac	aactcttcaa	attacttgca	ggggacagag	ggacttggac	180
	tggtctttggc	ccaataatca	gagtggcagt	gagcaaaggg	tggaggtgac	tgagtgcagc	240
	gatggcctct	tctgtaagac	actcacaatt	ccaaaagtga	tcggaaatga	cactggagcc	300
	tacaagtgt	tctaccggga	aactgacttg	gcctcggtca	tttatgtcta	tgttcaagat	360
	tacagatctc	cattttattgc	ttctgttagt	gaccaacatg	gagtcgtgta	cattactgag	420
15	aacaaaaaca	aaactgtggt	gattccatgt	ctcgggtcca	tttcaaactc	caacgtgtca	480
	ctttgtgcaa	gatacccaga	aaagagattt	gttcctgatg	gtaacagaat	ttcctgggac	540
	agcaagaagg	gctttactat	tcccagctac	atgatcagct	atgctggcat	ggctcttctgt	600
	gaagcaaaaa	ttaatgatga	aagttaccag	tctattatgt	acatagtgtg	cgttgtaggg	660
	tataggattt	atgatgtggt	tctgagtcgg	tctcatggaa	ttgaactatc	tggttgagaa	720
20	aagcttgtct	taaattgtac	agcaagaact	gaactaaatg	tggggattga	cttcaactgg	780
	gaataccctt	cttcgaagca	tcagcataag	aaacttgtaa	accgagacct	aaaaaccagg	840
	tctgggagtg	agatgaagaa	atttttgagc	accttaacta	tagatggtgt	aaccggagt	900
	gaccaaggat	tgtacacctg	tgcagcatcc	agtgggctga	tgaccaagaa	gaacagagca	960
	tttgtcaggg	tccatgaaaa	accttttgtt	gcttttggaa	gtggcatgga	atctctggtg	1020
25	gaagccacgg	tggggggagcg	tgtcagaatc	cctgcgaagt	accttggtta	cccaccccca	1080
	gaaataaaaat	ggtataaaaa	tggaataccc	cttgagtcca	atcacacaat	taaagcgggg	1140
	catgtactga	cgattatgga	agtgagtga	agagacacag	gaaattacac	tgatcatcctt	1200
	accaatccca	tttcaaagga	gaagcagagc	catgtggtct	ctctggttgt	gtatgtccca	1260
	cccagatttg	gtgagaaatc	tctaattctct	cctgtggatt	cctaccagta	cggcaccact	1320
30	caaacgctga	catgtacggt	ctatgccatt	cctccccgc	atcacatcca	ctggtattgg	1380
	cagttggagg	aagagtgcgc	caacgagccc	agccaagctg	tctcagtgc	aaaccatac	1440
	ccttgtagaag	aatggagaag	tgtggaggac	ttccagggag	gaaataaaaat	tgaagttaat	1500
	aaaaatcaat	ttgctcta	tgaaggaaaa	aacaaaactg	taagtaccct	tggtatccaa	1560
	gcgggcaaatg	tgctcagcttt	gtacaaatgt	gaagcgggtca	acaaagtcgg	gagaggagag	1620
35	aggggtgatct	ccttccacgt	gaccaggggt	cctgaaatta	ctttgcaacc	tgacatgcag	1680
	cccactgagc	aggagagcgt	gtctttgtgg	tgcaactgcag	acagatctac	gtttgagaac	1740
	ctcacatggt	acaagccttg	cccacagcct	ctgccaatcc	atgtgggaga	gttgcccaca	1800
	cctgtttgca	agaacttgga	tactcttttg	aaattgaatg	ccaccatggt	ctctaatagc	1860
	acaaatgaca	ttttgatcat	ggagcttaag	aatgcaccc	tgcaaggacca	aggagacat	1920
40	gtctgccttg	ctcaagacag	gaagaccaag	aaaagacatt	gcgtgggtcag	gcagctcaca	1980
	gtcctagagc	gtgtggcacc	cacgatcaca	ggaaacctgg	agaatcagac	gacaagtatt	2040
	ggggaaagca	tcgaagtctc	atgcacggca	tctgggaatc	cccctccaca	gatcatgtgg	2100
	tttaagata	atgagaccct	tgtagaagac	tcaggcattg	tattgaagga	tgggaaccgg	2160
	aacctcacta	tccgcagagt	gaggaaggag	gacgaaggcc	tctacacctg	ccaggcatgc	2220
45	agtgttcttg	gctgtgcaaa	agtggaggca	tttttcataa	tagaagggtgc	ccaggaaaag	2280
	acgaacttgg	aaatcattat	tctagtaggc	acggcgggtga	ttgccatggt	cttctggcta	2340
	cttcttgc	tcacccatag	gaccgttaag	cgggccaatg	gaggggaact	gaagacaggc	2400
	tacttgc	ctgtcatgga	tccagatgaa	ctcccattgg	atgaacattg	tgaacgactg	2460
	ccttatgatg	ccagcaaatg	ggaattcccc	agagaccggc	tgaagctagg	taagcctctt	2520
50	ggccgtgggtg	ccttttgcca	agtgttccca	gcagatgcct	ttggaattga	caagacagca	2580
	acttgcagga	cagtagcagt	caaaatgttg	aaagaaggag	caacacacag	tgagcatcga	2640
	gctctcatgt	ctgaactcaa	gatcctcatt	catattgggtc	accatctcaa	tgtggtcaac	2700
	cttctaggtg	cctgtaccaa	gccaggaggg	ccactcatgg	tgattgtgga	attctgcaa	2760
	tttgaaacc	tgtccactta	cctgaggagc	aagagaaatg	aatttgtccc	ctacaagacc	2820
55	aaaggggcac	gattccgtca	agggaaagac	tacgttggag	caatccctgt	ggatctgaaa	2880
	cggcgcttgg	acagcatcac	cagtagccag	agctcagcca	gctctggatt	tgtagggag	2940
	aagtcctca	gtgatgtaga	agaagaggaa	gctcctgaag	atctgtataa	ggacttctctg	3000
	accttgagc	atctcatctg	ttacagcttc	caagtggcta	agggcatgga	gttcttggca	3060
	tcgcgaaagt	gtatccacag	ggacctggcg	gcacgaaata	tcctcttatc	ggagaagaac	3120
60	gtggttaaaa	tctgtgactt	tggtctggcc	cgggatattt	ataaagatcc	agattatgtc	3180
	agaaaaggag	atgctcgctt	ccctttgaaa	tggatggccc	cagaaacaat	ttttgacaga	3240
	gtgtacacaa	tccagagtga	cgtctggtct	tttgggtgtt	tgctgtggga	aatattttcc	3300

```

5  ttaggtgctt ctccatatcc tggggtaaag attgatgaag aattttgtag gcgattgaaa 3360
   gaaggaacta gaatgagggc ccctgattat actacaccag aaatgtacca gaccatgctg 3420
   gactgctggc acggggagcc cagtcagaga cccacgtttt cagagttggt ggaacatttg 3480
   ggaaatctct tgcaagctaa tgctcagcag gatggcaaaag actacattgt tcttccgata 3540
10  tcagagactt tgagcatgga agaggattct ggactctctc tgcctacctc acctgtttcc 3600
   tgtatggagg aggaggaagt atgtgacccc aaattccatt atgacaacac agcaggaatc 3660
   agtcagtatc tgcagaacag taagcgaaag agccggcctg tgagtgtaaa aacatttgaa 3720
   gatatcccgt tagaagaacc agaagtaaaa gtaatccag atgacaacca gacggacagt 3780
   ggtatgggtt ttgcctcaga agagctgaaa actttggaag acagaaccaa attatctcca 3840
15  tcttttgggt gaatgggtgcc cagcaaaagc agggagtctg tggcatctga aggctcaaac 3900
   cagacaagcg gctaccagtc cggatatcac tccgatgaca cagacaccac cgtgtactcc 3960
   agtgaggaag cagaactttt aaagctgata gagattggag tgcaaaccgg tagcacagcc 4020
   cagattctcc agcctgactc ggggaccaca ctgagctctc ctctgttta a 4071

15  <210> 98
   <211> 1410
   <212> DNA
   <213> Homo sapiens

20  <300>
   <302> MMP1
   <310> M13509

25  <400> 98
   atgcacagct ttcctccact gctgctgctg ctgttctggg gtgtgggtgtc tcacagcttc 60
   ccagcgactc tagaaacaca agagcaagat gtggacttag tccagaaata cctggaaaaa 120
   tactacaacc tgaagaatga tgggaggcaa gttgaaaagc ggagaaatag tggcccagtg 180
30  gttgaaaaat tgaagcaaat gcaggaattc tttgggctga aagtgactgg gaaaccagat 240
   gctgaaaccc tgaaggtgat gaagcagccc agatgtggag tgctgatgt ggctcagttt 300
   gtcctcactg agggaaaccc tcgctgggag caaacacatc tgagggtacag gattgaaaat 360
   tacacgccag atttgccaag agcagatgtg gaccatgccca ttgagaaagc cttccaactc 420
   tggagtaatg tcacacctct gacattcacc aaggtctctg aggggtcaagc agacatcatg 480
35  atatcttttg tcaggggaga tcatcgggac aactctcctt ttgatggacc tggaggaaat 540
   cttgctcatg cttttcaacc aggccaggtt attggagggg atgctcattt tgatgaagat 600
   gaaaggtgga ccaacaattt cagagagtac aacttacatc gtgttgccgc tcatgaactc 660
   ggccattctc ttggactctc ccattctact gatatcgggg ctttgatgta ccctagctac 720
   accttcagtg gtgatgttca gctagctcag gatgacattg atggcatcca agccatata 780
40  ggacgttccc aaaaatcctgt ccagcccacg ggcccacaaa ccccaaaagc gtgtgacagt 840
   aagctaacct ttgatgctat aactacgatt cggggagaag tgatgttctt taaagacaga 900
   ttctacatgc gcacaaatcc cttctaccgg gaagttgagc tcaatttcat ttctgttttc 960
   tggccacaac tgccaaatgg gcttgaagct gcttacgaat ttgccgacag agatgaagtc 1020
   cggtttttca aagggataaa gtactgggct gttcagggac agaattgtgt acacggatac 1080
45  cccaaggaca tctacagctc ctttggcttc cctagaactg tgaagcatat cgatgctgct 1140
   ctttctgagg aaaacactgg aaaaacctac ttctttgttg ctaacaaata ctggaggat 1200
   gatgaatata aacgatctat ggatccaagt tatcccaaaa tgatagcaca tgactttcct 1260
   ggaattggcc acaaagttga tgcagttttc atgaaagatg gatttttcta tttctttcat 1320
   ggaacaagac aatacaaat tgcctctaaa acgaagagaa ttttgactct ccagaaagct 1380
50  aatagctggt tcaactgcag gaaaaattga 1410

   <210> 99
   <211> 1743
   <212> DNA
55  <213> Homo sapiens

   <300>
   <302> MMP10
   <310> XM006269

60  <400> 99
   aaagaaggta agggcagtga gaatgatgca tcttgcatcc cttgtgctgt tgtgtctgcc 60

```

5 agtctgctct gcctatcctc tgagtggggc agcaaaagag gaggactcca acaaggatct 120
 tgcccagcaa tacctagaaa agtactacaa cctcgaaaag gatgtgaaac agtttagaag 180
 aaaggacagt aatctcattg ttaaaaaaat ccaaggaatg cagaagtcc ttgggttgga 240
 ggtgacaggg aagctagaca ctgacactct ggaggtgatg cgcaagccca ggtgtggagt 300
 10 tcttgacggt ggtcacttca gctcctttcc tggcatgccc aagtggagga aaacccacct 360
 tacatacagg attgtgaatt atacaccaga tttgccaaaga gatgctgttg attctgccat 420
 tgagaaagct ctgaaagtct gggaagaggt gactccactc acattctcca ggctgtatga 480
 aggagagggt gatataatga tctcttttgc agttaaaaga catggagact tttactcttt 540
 tgatggccca ggacacagtt tggctcatgc ctaccacact ggacctgggc tttatggaga 600
 15 tattcacttt gatgatgatg aaaaatggac agaagatgca tcaggcacca atttattcct 660
 cgttgctgct catgaacttg gccactccct ggggctcttt cactcagcca acactgaagc 720
 tttgatgtac ccactctaca actcattcac agagctcgcc cagttccgcc tttegcaaga 780
 tgatgtgaat ggcattcagt ctctctacgg acctccccct gcctctactg aggaacccct 840
 ggtgcccaca aaatctgttc ctctggggtc tgagatgcca gccaaagtgtg atcctgcttt 900
 20 gtctctogag gccatcagca ctctgagggg agaatatctg ttctttaaag acagatattt 960
 ttggcgaaga tcccactgga accctgaacc tgaatttcat ttgatttctg cattttggcc 1020
 ctctcttcca tcatatttgg atgctgcata tgaagttaac agcagggaca ccgtttttat 1080
 ttttaaagga aatgagttct gggccatcag aggaaatgag gtacaagcag gttatccaag 1140
 25 aggcattccat accctgggtt ttctctcaac cataaggaaa attgatgcag ctgtttctga 1200
 caaggaaaag aagaaaacat acttctttgc agcggacaaa tactggagat ttgatgaaaa 1260
 tagccagtcc atggagcaag gcttccctag actaatagct gatgactttc caggagttag 1320
 gcctaagggt tttgacctga tacaggcatt tggatttttc tacttcttca gtggatcatc 1380
 acagtttgag tttgacccca atgccaggat ggtgacacac atattaaaga gtaacagctg 1440
 gttacattgc taggcgagat agggggaaga cagatatggg tgtttttaat aaatctaata 1500
 30 attattcatc taatgtatta tgagccaaaa tgggttaattt ttctgcatg ttctgtgact 1560
 gaagaagatg agccttgcat atatctgcat gtgtcatgaa gaatgtttct ggaattcttc 1620
 acttgctttt gaattgcact gaacagaatt aagaaatact catgtgcaat aggtgagaga 1680
 atgtattttc atagatgtgt tattacttcc tcaataaaaa gttttatttt gggcctgttc 1740
 ctt 1743

<210> 100
 <211> 1467
 <212> DNA
 35 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> MMP11
 <310> XM009873

40 <400> 100

atggctccgg ccgcctggct ccgcagcgcg gccgcgcgcg ccctcctgcc cccgatgctg 60
 ctgctgctgc tccagccggc gccgctgctg gcccgggctc tgccgcggga cggccaccac 120
 45 ctccatgccc agaggagggg gccacagccc tggcatgcag cctgcccag ctagccggca 180
 cctgcccctg ccacgcagga agcccccccg cctgccagca gcctcaggcc tcccgcgtgt 240
 ggcgtgcccc accatctga tgggctgagt gcccgcaacc gacagaagag gttcgtgctt 300
 tctggcgggc gctgggagaa gacggacctc acctacagga tccttcgggtt cccatggcag 360
 ttggtgcagg agcagggtgc gcagacgatg gcagaggccc taaaggatat gagcgtgtg 420
 50 acgccactca cctttactga ggtgcacgag ggcgctgctg acatcatgat cgacttcgac 480
 aggtactggc atggggacga cctgcccgtt gatgggcctg ggggcaccc ggcccatgcc 540
 ttcttcccca agactcaccg agaaggggat gtccacttcg actatgatga gacctggact 600
 atcggggatg accagggcac agacctgctg caggtggcag cccatgaatt tggccacgtg 660
 ctggggctgc agcacacaac agcagccaag gccctgatgt ccgccttcta caccttctgc 720
 55 taccactga gtctcagccc agatgactgc aggggcgttc aacacctata tggccagccc 780
 tggccactg tcacctccag gacccagccc ctgggcccc aggctgggat agacaccaat 840
 gagattgcac cgctggagcc agacgcccc ccagatgcct gtgaggcctc ctttgacgag 900
 gtctccacca tccgaggcga gctcttttcc ttcaaagcgg gctttgtgtg gcgcctccgt 960
 gggggccagc tgcagcccg ctacccagca ttggcctctc gccactggca gggactgccc 1020
 60 agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc caggggcaca tttggttctt ccaagggtgt 1080
 cagtactggg tgtacgacgt tgaaaagcca gtcctgggac cgcacccct caccgagctg 1140
 ggcctgggtg ggttcccggt ccatgctgcc ttggctgtgg gtcccagaaa gaacaagatc 1200
 tacttcttcc gaggcaggga ctactggcgt ttccacccca gcacccggcg tgtagacagt 1260

cccgtgcccc gcagggccac tgactggaga ggggtgccct ctgagatcga cgctgccttc 1320
caggatgctg atggctatgc ctacttcctg cgcggccgcc tctactggaa gtttgaccct 1380
gtgaagggtga aggctctgga aggtctcccc cgtctcgtgg gtcctgactt ctttggtgtg 1440
gccgagcctg ccaacacttt cctctga 1467

5

<210> 101
<211> 1653
<212> DNA
10 <213> Homo sapiens

<300>
<302> MMP12
<310> XM006272

15

<400> 101
atgaagtttc ttctaatact gtcctgcag gccactgctt ctggagctct tccccgaac 60
agctctacaa gcctggaaaa aaataatgtg ctatttggtg agagatactt agaaaaattt 120
tatggccttg agataaacia acttccagtg acaaaaatga aatatagtgg aaacttaatg 180
20 aaggaaaaaa tccaagaaat gcagcacttc ttgggtctga aagtgaccgg gcaactggac 240
acatctaccc tggagatgat gcacgcacct cgatgtggag tccccgatgt ccatcatttc 300
agggaaatgc cagggggggcc cgtatggagg aaacattata tcacctacag aatcaataat 360
tacacacctg acatgaaccg tgaggatgtt gactacgcaa tccggaaagc tttccaagta 420
tgaggtaatg ttacccctt gaaattcagc aagattaaca caggcatggc tgacattttg 480
25 gtgggtttttg cccgtggagc tcatggagac ttccatgctt ttgatggcaa aggtggaatc 540
ctagcccatg cttttggacc tggatctggc attggagggg atgcacattt cgatgaggac 600
gaattctgga ctacacattc aggagnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780
30 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngagag gatccaaagg ccgtaatgtt cccccactac 960
aaatatgttg acatcaaacac atttcgcctc tctgctgatg acatacgtgg cattcagtc 1020
ctgtatggag acccaaaaga gaaccaacgc ttgccaaatc ctgacaattc agraccagct 1080
35 ctctgtgacc ccaatttgag ttttgatgct gtcactaccg tgggaaataa gatctttttc 1140
ttcaaagaca ggttcctctg gctgaagggt tctgagagac caaagaccag tgtaatttta 1200
atttcttctc tatggccaac cttgccatct ggcattgaag ctgcttatga aattgaagcc 1260
agaaatcaag tttttctttt taaagatgac aaatactggg taattagcaa tttaagacca 1320
40 gagccaaatt atcccaagag catacattct tttggttttc ctaactttgt gaaaaaaatt 1380
gatgcagctg tttttaaccc acgtttttat aggacctact tctttgtaga taaccagtat 1440
tgagggtatg atgaaaggag acagatgatg gaccctggtt atcccaaact gattaccaag 1500
aacttccaag gaatcgggcc taaaattgat gcagtcttct actctaaaaa caaatactac 1560
tatttcttc aaggatctaa ccaatttgaa tatgacttcc tactccaacg tatcaccaaa 1620
45 acactgaaaa gcaatagctg gtttggttgt tag 1653

<210> 102
<211> 1416
<212> DNA
50 <213> Homo sapiens

<400> 102
atgcatccag gggctcctggc tgccttcctc ttcttgagct ggactcattg tggggccctg 60
ccccttccca gtgggtggtga tgaagatgat ttgtctgagg aagacctcca gtttgagag 120
55 cgctacctga gatcatacta ccatcctaca aatctcgcgg gaatcctgaa ggagaatgca 180
gcaagctcca tgactgagag gctccgagaa atgcagtctt tcttcggctt agaggtgact 240
ggcaaaactg acgataacac cttagatgtc atgaaaagc caagatgcgg gggttcctgat 300
gtgggtgaat acaatgtttt cctcgaact cttaaattgg ccaaaatgaa tttaacctac 360
agaattgtga attacacccc tgatatgact cattctgaag tcgaaaaggc attcaaaaaa 420
60 gccttcaaag tttggtccga tgtaactcct ctgaatttta ccagacttca cgatggcatt 480
gctgacatca tgatctcttt tggaaattaag gagcatggcg acttctaccc atttgatggg 540
ccctctggcc tgctggctca tgcttttctt cctgggcca aattatggagg agatgcccat 600

5 tttgatgatg atgaaacctg gacaagtagt tccaaaggct acaacttggt tcttggtgct 660
 gcgcgatgagt tcggccactc cttaggctctt gaccactcca aggaccctgg agcactcatg 720
 tttcctatct acacctacac cggcaaaagc cactttatgc ttcctgatga cgatgtacaa 780
 gggatccagt ctctctatgg tccaggagat gaagacccca accctaaaca tccaaaaacg 840
 ccagacaaat gtgaccttc cttatccctt gatgccatta ccagtctccg aggagaaaca 900
 atgatcttta aagacagatt cttctggcgc ctgcctctc agcagggtga tgcggagctg 960
 tttttaacga aatcattttg gccagaactt cccaaccgta ttgatgctgc atatgagcac 1020
 ccttctcatg acctcatctt catcttcaga ggtagaaaat tttgggctct taatgggttat 1080
 10 gacattctgg aagggttatcc caaaaaata tctgaactgg gtcttccaaa agaagttaag 1140
 aagataagtg cagctgttca ctttgaggat acaggcaaga ctctcctggt ctcaggaaac 1200
 caggtctgga gatatgatga tactaaccat attatggata aagactatcc gagactaata 1260
 gaagaagact tcccaggaat tgggtataaa gtagatgctg tctatgagaa aaatgggttat 1320
 atctatcttt tcaacggacc catacagttt gaatacagca tctggagtaa ccgtattggt 1380
 15 cgcgtcatgc cagcaaatcc cattttgtgg tgttaa 1416

<210> 103
 <211> 1749
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> MMP14
 <310> NM004995

25 <400> 103

30 atgtctcccc ccccaagacc cccccgttgt ctctgctcc ccctgctcac gctcggcacc 60
 gcgctcgccct ccctcggctc ggcccaaagc agcagcttca gccccgaagc ctgggtacag 120
 caatatggct acctgcctcc cggggaccta cgtaccacaca cacagcgctc accccagtc 180
 ctctcagcgg ccctcgtcgc catgcagaag ttttacggct tgcaagtaac aggcaaagct 240
 gatgcagaca ccataaaggc catgaggcgc ccccgatgtg gtgttccaga caagtttggg 300
 gctgagatca aggccaatgt tcgaaggaa cgtacgcca tccagggtct caaatggcaa 360
 cataatgaaa tcactttctg catccagaat tacaccccca aggtgggcca gtatgccaca 420
 35 tacgaggcca ttcgcaaggc gttccgcgtg tgggagagtg ccacaccact gcgcttccgc 480
 gaggtgcctt atgcctacat ccgtgagggc catgagaagc aggcgcacat catgatcttc 540
 tttgccgagg gcttccatgg cgacagcacg cccttcgatg gtgagggcgg ctctcctggc 600
 catgcctact tcccaggccc caacattgga ggagacaccc actttgactc tgccgagcct 660
 tggactgtca ggaatgagga tctgaatgga aatgacatct tcctggtggc tgtgcacgag 720
 ctgggccatg ccctggggct cgagcattcc agtgacccct cggccatcat ggcacccttt 780
 40 taccagtggg tggacacgga gaattttgtg ctgcccgatg atgaccgccc gggcatccag 840
 caactttatg ggggtgagtc aggggttcccc accaagatgc cccctcaacc caggactacc 900
 tcccggcctt ctgttctctga taaacccaaa aacccacact atgggcccga catctgtgac 960
 gggaactttg acaccgtggc catgctccga ggggagatgt ttgtcttcaa ggagcgctgg 1020
 45 ttctggcggg tgaggaataa ccaagtgatg gatggatacc caatgccat tggccagttc 1080
 tggcggggcc tgcttgcgtc catcaacact gcctacgaga ggaaggatgg caaattcgtc 1140
 ttcttcaaag gagacaagca ttgggtgttt gatgaggcgt ccctggaacc tggctacccc 1200
 aagcacatta aggagctggg ccgagggctg cctaccgaca agattgatgc tgctctcttc 1260
 tggatgcccc atggaaagac ctacttcttc cgtggaaaca agtactaccg tttcaacgaa 1320
 50 gagctcaggg cagtggatag cgagtacccc gatgaagtct tcacttactt ctacaagggg 1440
 gagtctocca gagggtcatt catgggcagc ctgaaggtag aaccgggcta ccccaagtca 1500
 aacaaatact ggaaattcaa caaccagaag ggaggccggc cggatgaggg gactgaggag 1560
 gccctgaggg actggatggg ctgcccacgc gagggagggc gcgggcggt gagcgcggt 1620
 gagacggagg tgatcatcat tgaggtggac ctggtgctgg cggtgggctt tgcagtcttc 1680
 55 gccgtgggtg tgcccggtg gctgctgctc ctgctctact gccagcggtc cctgctggac 1740
 aaggtctga

60 <210> 104
 <211> 2010
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
<302> MMP15
<310> NM002428

5

<400> 104

	atgggagcgc	acccgagcgc	gcccggagcg	ccgggctgga	cgggcagcct	cctcggcgac	60
	cgggaggagg	cggcgcgcc	gcgactgctg	ccgctgctcc	tgggtgcttct	gggctgcctg	120
10	ggccttgccg	tagcggccga	agacgcggag	gtccatgccc	agaactggct	gcggctttat	180
	ggctacctgc	ctcagcccag	ccgccatatg	tccaccatgc	gttccgccc	gatcttggcc	240
	tcggcccttg	cagagatgca	gcgctttctac	gggatcccag	tcaccgggtg	gctcgacgaa	300
	gagaccaagg	agtggatgaa	gcggccccgc	tgtgggggtg	cagaccagtt	cgggggtacga	360
	gtgaaagcca	acctgcggcg	gcgtcggaag	cgctacgccc	tcaccgggag	gaagtggaaac	420
	aaccaccatc	tgacctttag	catccagaac	tacacggaga	agttggggctg	gtaccactcg	480
15	atggaggcgg	tgcgagggc	cttcgcgctg	tgggagcagg	ccacgccccct	ggtcttccag	540
	gaggtgccct	atgaggacat	ccggctgcgg	cgacagaagg	aggccgacat	catgggtactc	600
	tttgctctg	gcttccacgg	cgacagctcg	ccgtttgatg	gcaccgggtgg	ctttctggcc	660
	cacgcctatt	tccttgcccc	cggcctaggg	ggggacaccc	atthttgacgc	agatgagccc	720
	tggaccttct	ccagcactga	cctgcctgga	aacaacctct	tcctgggtggc	agtgcctgag	780
20	ctggggcacg	cgctggggct	ggagcactcc	agcaacccca	atgccatcat	ggcgccgcttc	840
	taccagtggg	aggacgttga	caacttcaag	ctgcccaggg	acgatctccg	tggcatccag	900
	cagctctacg	gtaccccaga	cggtcagcca	cagcctaccc	agcctctccc	cactgtgacg	960
	ccacggcgcc	caggccggcc	tgaccaccgg	ccgccccggc	ctccccagcc	accaccccca	1020
25	ggtggggaag	cagagcggcc	cccaaagccg	ggccccccag	tccagccccg	agccacagag	1080
	cggcccgacc	agtatggccc	caacatctgc	gacgggggact	ttgacacagt	ggccatgctt	1140
	cgcggggaga	tgttcgtgtt	caagggccgc	tggttctggc	gagtccggca	caaccgcgtc	1200
	ctggacaact	atcccagccc	catcgggcac	ttctggcgctg	gtctgcccgg	tgacatcagt	1260
	gctgcctacg	agcgccaaga	cggtcgtttt	gtctttttca	aaggtgaccg	ctactggctc	1320
30	tttcgagaag	cgaacctgga	gcccggctac	ccacagccgc	tgaccagcta	tggcctgggc	1380
	atccccctatg	accgcattga	cacggccatc	tgggtgggagc	ccacaggcca	caccttcttc	1440
	ttccaagagg	acaggtactg	gcgcttcaac	gaggagacac	agcgtgggag	ccctgggtac	1500
	cccaagccca	tcagtgtctg	gcaggggatc	cctgcctccc	ctaaaggggc	cttcctgagc	1560
	aatgacgcag	cctacaccta	cttctacaag	ggcaccaaat	actggaaatt	cgacaatgag	1620
35	cgctgcgga	tggagcccgg	ctaccccaag	tccatcctgc	gggacttcat	gggctgccag	1680
	gagcacgtgg	agccaggccc	ccgatggccc	gacgtggccc	ggccgcccct	caacccccac	1740
	gggggtgcag	agcccggggc	ggacagcgca	gagggcgacg	tgggggatgg	ggatggggac	1800
	tttggggccg	gggtcaacaa	ggacgggggc	agccgcgtgg	tgggtgcagat	ggaggagggtg	1860
	gcacggacgg	tgaacgtggt	gatgggtgctg	gtgcccactgc	tgctgctgct	ctgctgcctg	1920
40	ggcctcacct	acgcgctggt	gcagatgcag	cgcaaggggtg	cggcacgtgt	cctgctttac	1980
	tgcaagcgct	cgctgcagga	gtgggtctga				2010

<210> 105
<211> 1824
45 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> MMP16
50 <310> NM005941

<400> 105

	atgatcttac	tcacattcag	cactggaaga	cggttggatt	tcgtgcatca	ttcggggggtg	60
	ttttctcttg	aaaccttgct	ttggatttta	tgtgctacag	tctgcggaac	ggagcagtat	120
55	ttcaatgtgg	aggtttgggt	acaaaagtac	ggctaccttc	caccgactga	ccccagaatg	180
	tcagtgtctg	gctctgcaga	gaccatgcag	tctgccctag	ctgccatgca	gcagttctat	240
	ggcattaaca	tgacaggaaa	agtggacaga	aacacaattg	actggatgaa	gaagccccga	300
	tgcgggtgtac	ctgaccagac	aagaggtagc	tccaaatttc	atattcgtcg	aaagcgatat	360
	gcattgacag	gacagaaatg	gcagcacaag	cacatcactt	acagtataaa	gaacgtaact	420
60	ccaaaagtga	gagaccctga	gactcgtaaa	gctattcgcc	gtgcctttga	tgtgtggcag	480
	aatgtaactc	ctctgacatt	tgaagaagtt	ccctacagtg	aattagaaaa	tggcaaacgt	540
	gatgtggata	taaccattat	ttttgcatct	ggtttccatg	gggacagctc	tccttttgat	600

5 ggagagggag gatttttggc acatgcctac ttccctggac caggaattgg aggagatacc 660
 cattttgact cagatgagcc atggacacta ggaaatccta atcatgatgg aaatgactta 720
 tttctttag cagtccatga actgggacat gctctgggat tggagcattc caatgacccc 780
 actgccatca tggctccatt ttaccagtac atggaaacag acaacttcaa actacctaata 840
 gatgattttac agggcatcca gaaaatatat ggtccacctg acaagattcc tccacctaca 900
 agacctctac cgacagtgcc cccacaccgc tctattcctc cggctgaccc aaggaaaaat 960
 gacaggccaa aacctcctcg gcctccaacc ggacagacct cctatcccgg agccaaaccc 1020
 aacatctgtg atgggaactt taacactcta gctattcttc gtcgtgagat gtttgttttc 1080
 aaggaccagt ggttttggcg agtgagaaac aacagggtga tggatggata cccaatgcaa 1140
 10 attacttact tctggcgggg cttgcctcct agtatcgatg cagtttatga aaatagcgac 1200
 gggaattttg tgttctttaa aggtaacaaa tattgggtgt tcaaggatac aactcttcaa 1260
 cctggttacc ctcatgactt gataaccctt ggaagtggaa ttccccctca tgggtattgat 1320
 tcagccattt ggtgggagga cgtcgggaaa acctatttct tcaagggaga cagatattgg 1380
 agatatagtg aagaaatgaa aacaatggac cctggctatc ccaagccaat cacagtctgg 1440
 15 aaagggatcc ctgaatctcc tcagggagca tttgtacaca aagaaaatgg ctttacgtat 1500
 ttctacaaag gaaaggagta ttggaaattc aacaaccaga tactcaaggt agaacttggaa 1560
 catccaagat ccacctcaa ggattttatg ggctgtgatg gaccaacaga cagagttaaa 1620
 gaaggacaca gccaccaga tgatgtagac attgtcatca aactggacaa cacagccagc 1680
 actgtgaaag ccatagctat tgcattcccc tgcattctgg ccttatgcct ccttgtattg 1740
 20 gtttacactg tgttccagtt caagagggaa ggaacacccc gccacatact gtactgtaaa 1800
 cgctctatgc aagagtgggt gtga 1824

25 <210> 106
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <300>
 <302> MMP17
 <310> NM004141

35 <400> 106
 atgcagcagt ttggtggcct ggaggccacc ggcacacctg acgaggccac cctggccctg 60
 atgaaaaccc cacgctgctc cctgccagac ctccctgtcc tgacccaggc tcgcaggaga 120
 cgccaggctc cagccccac caagtggaa aagaggaacc tgctcgtggag ggtccggacg 180
 ttcccacggg actcaccact ggggcacgac acggtgctgt cactcatgta ctacgccctc 240
 aaggtctgga gcgacattgc gccctgaac ttccacgagg tggcgggcag caccgccgac 300
 40 atccagatcg acttctccaa ggccgacat aacgacggct accccttcga cggccccggc 360
 ggcaccgtgg cccacgcctt cttccccggc caccaccaca ccgccgggga caccactttt 420
 gacgatgacg aggcctggac cttccgctcc tcggatgccc acgggatgga cctgtttgca 480
 gtggctgtcc acgagtttgg ccacgccatt ggggttaagc atgtggccgc tgcacactcc 540
 atcatgcggc cgtactacca gggcccggtg ggtgacccgc tgcgtacgg gctccccctac 600
 gaggacaagg tgcgctctg gcagctgtac ggtgtgctgg agtctgtgtc tcccacggcg 660
 45 cagcccagg agcctccct gctgccggag ccccagaca accggtccag cgccccgcc 720
 aggaaggacg tgccccacag atgcagcact cactttgacg cgggtggccca gatccggggt 780
 gaagctttct tcttcaaagg caagtacttc tggcggctga cgcgggaccg gcacctgggtg 840
 tccttgacgc cggcacagat gcaccgcttc tggcggggcc tgccgctgca cctggacagc 900
 gtggacgccc tgtacgagcg caccagcgac cacaagatcg tcttctttaa aggagacagg 960
 50 tactgggtgt tcaaggacaa taacgtagag gaaggatacc cgcgccccgt ctccgacttc 1020
 agcctccgcg ctggcggcat cgacgctgcc ttctcctggg ccacaaatga caggacttat 1080
 ttctttaaagg accagctgta ctggcgctac gatgaccaca cgaggcacat ggacccccggc 1140
 taccgccccc agagccccct gtggaggggt gtccccagca cgtggacga cgccatgcgc 1200
 55 tggtcggacg gtgcctccta cttcttccgt ggccaggagt actggaaagt gctggatggc 1260
 gagctggagg tggcacccgg gtaccacag tccacggccc gggactggct ggtgtgtgga 1320
 gactcacagg ccgatggatc tgtggctgcg ggcgtggacg cggcagaggg gcccccgcgc 1380
 cctccaggac aacatgacca gagccgctcg gaggacgggt acgaggtctg ctcatgcacc 1440
 tctggggcat cctctcccc gggggcccc gggccactgg tggctgccac catgctgctg 1500
 60 ctgctgcgcg cactgtcacc aggcgccctg tggacagcgg ccaggccct gacgctatga 1560

<210> 107

<211> 1983
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5 <300>
<302> MMP2
<310> NM004530

<400> 107
10 atggaggcgc taatggcccc gggcgcgctc acgggtcccc tgagggcgct ctgtctcctg 60
ggctgcctgc tgagccacgc cgccgcccgc ccgtcgccca tcatcaagtt ccccggcgat 120
gtcgccccca aaacggacaa agagtgtggca gtgcaatacc tgaacacctt ctatggctgc 180
cccaaggaga gctgcaacct gtttgtgctg aaggacacac taaagaagat gcagaagttc 240
tttggactgc ccagacagc tgatcttgac cagaatacca tcgagaccat gcggaagcca 300
15 cgctgcggca acccagatgt ggccaactac aacttcttcc ctcgcaagcc caagtgggac 360
aagaaccaga tcacatacag gatcattggc tacacacctg atctggacce agagacagtg 420
gatgatgcct ttgctcgtgc cttccaagtc tggagcgatg tgacccact gcggttttct 480
cgaatccatg atggagaggg agacatcatg atcaactttg gccgctggga gcatggcgat 540
ggatacccct ttgacggtaa ggacggactc ctggctcatg ccttcgcccc aggcactggg 600
20 gttgggggag actcccattt tgatgacgat gagctatgga ccttgggaga aggccaagtg 660
gtccgtgtga agtatggcaa cgccgatggg gactactgca agttcccctt cttgttcaat 720
ggcaaggagt acaacagctg cactgatact ggccgcagcg atggcttctt ctggtgctcc 780
accacctaca actttgagaa ggatggcaag tacggcttct gtcccatga agccctgttc 840
acatggggcg gcaacgctga aggacagccc tgcaagtttc cattccgctt ccagggcaca 900
25 tcctatgaca gctgcaccac tgagggccgc acggatgggt accgctggtg cggcaccact 960
gaggactacg accgcgacaa gaagtatggc ttctgcccct agaccgccat gtccactgtt 1020
ggtgggaact cagaagggtc cccctgtgtc ttccccttca ctttcctggg caacaaatat 1080
gagagctgca ccagcgccgg ccgcagtgcg ggaaagatgt ggtgtgcgac cacagccaac 1140
tacgatgacg accgcaagtg gggcttctgc cctgaccaag ggtacagcct gttcctcgtg 1200
30 gcagcccacg agtttgggca cgccatgggg ctggagcact cccaagacct tggggcccctg 1260
atggcaccca ttacaccta caccaagaac ttccgtctgt cccaggatga catcaagggc 1320
attcaggagc tctatggggc ctctcctgac attgaccttg gcaccggccc cacccccaca 1380
ctggggcccctg tcaactcctga gatctgcaaa caggacattg tatttgatgg catcgctcag 1440
atccgtggtg agatcttctt cttcaaggac cggttcattt ggcgactgt gacgccactg 1500
35 gacaagccca tggggcccct gctggtggcc acattctggc ctgagctccc ggaaaagatt 1560
gatgcggtat acgaggcccc acaggaggag aaggctgtgt tctttgcagg gaatgaatac 1620
tggatctact cagccagcac cctggagcga gggtaaccca agccactgac cagcctggga 1680
ctgccccctg atgtccagcg agtggatgcc gcctttaaact ggagcaaaaa caagaagaca 1740
tacatctttg ctggagacaa attctggaga tacaatgagg tgaagaagaa aatggatcct 1800
40 ggctttccca agctcatcgc agatgcctgg aatgccatcc ccgataacct ggatgccgtc 1860
gtggacctgc agggcgggcg tcacagctac ttcttcaagg gtgcctatta cctgaagctg 1920
gagaacaaaa gtctgaagag cgtgaagttt ggaagcatca aatccgactg gctaggctgc 1980
tga 1983

45 <210> 108
<211> 1434
<212> DNA
<213> Homo sapiens

50 <300>
<302> MMP2
<310> XM006271

55 <300>
<302> MMP3
<310> XM006271

<400> 108
60 atgaagagtc ttccaatcct actgttgctg tgcgtggcag tttgtcagc ctatccattg 60
gatggagctg caaggggtga ggacaccagc atgaaccttg ttcagaaata tctagaaaac 120
tactacgacc tcgaaaaaga tgtgaaacag tttgttagga gaaaggacag tggctcctgtt 180

<213> Homo sapiens

<300>

<302> MMP9

5 <310> XM009491

<400> 110

10 atgagcctct ggcagccctt ggtcctggtg ctctctggtg tgggctgctg ctttctgccc 60
cccagacagc gccagtcac ccttctgctc ttccctggag acctgagAAC caatctcacc 120
gacaggcagc tggcagagga atacctgtac cgctatggtt aactcgggt ggcagagatg 180
cgtggagagt cgaaatctct ggggcctgcg ctgctgcttc tccagaagca actgtccctg 240
cccagaccg gtgagctgga tagcgccacg ctgaaggcca tgcgaacccc acggtgcggg 300
gtcccagacc tgggcagatt ccaaaccctt gagggcgacc tcaagtggca ccaccacaac 360
atcacctatt ggatccaaaa ctactcgaa gacttgccgc gggcggtgat tgacgacgcc 420
15 tttgcccgcg ccttcgcact gtggagcgcg gtgacgcgcg tcaccttcac tcgctgttac 480
agccgggagc agacatcgt catccagttt ggtgtcgcg agcacggaga cgggtatccc 540
ttcgacggga aggacgggt cctggcacac gcctttcctc ctggccccgg cattcaggga 600
gacgcccatt tcgacgatga cgagttgtgg tccctgggca agggcgctcg ggttccaaact 660
cggtttggaa acgcagatgg cgcggcctgc cacttcccct tcatcttoga gggccgctcc 720
20 tactctgcct gcaccaccga cggctgcctc gacggcttgc cctggtgcag taccacggcc 780
aactacgaca ccgacgaccg gtttggcttc tgccccagcg agagactcta caccaggac 840
ggcaatgctg atgggaaacc ctgccagttt ccattcatct tccaaggcca atcctactcc 900
gcctgcacca cggacggctg ctccgacggc taccgctggt gcgccaccac cgccaactac 960
25 gaccgggaca agctcttcgg cttctgcccg acccgagctg actcgacggg gatggggggc 1020
aactcggcgg gggagctgtg cgtcttcccc ttacttttcc tgggtaagga gtactcgacc 1080
tgtaccagcg agggccgcgg agatgggcgc ctctggtgcg ctaccacctc gaactttgac 1140
agcgacaaga agtggggctt ctgccggac caaggataca gtttgttctt cgtggcgggc 1200
catgagttcg gccacgcgct gggcttagat cattcctcag tgccggaggc gctcatgtac 1260
cctatgtacc gcttactga ggggcccccc ttgcataagg acgacgtgaa tggcatccgg 1320
30 cactctatag gtctcgcgcc tgaacctgag ccacggcctc caaccaccac cacaccgcag 1380
cccacggctc ccccgacggg ctgccccacc ggacccccca ctgtccaccc ctcagagcgc 1440
cccacagctg gccccacagg tccccctca gctggcccca caggtcccc cactgctggc 1500
ccttctacgg ccactactgt gcctttgagt ccggtggacg atgctgcaa cgtgaacatc 1560
25 ttcgacgcca tcgcgagat tgggaaccag ctgtatttgt tcaaggatgg gaagtactgg 1620
cgattctctg agggcagggg gagccggccg cagggccctt tccttatcgc cgacaagtgg 1680
35 cccgcgctgc cccgcaagct ggactcggctc tttgaggagc ggctctcaa gaagcttttc 1740
ttcttctctg ggcgccaggt gtgggtgtac acaggcgctg cgtgctggg cccgaggcgt 1800
ctggacaagc tgggcttggg agccgagctg gccaggtga ccggggccct cggagtggc 1860
agggggaaga tgctgctgtt cagcgggcgg cgcctctgga ggttcgacgt gaaggcgagc 1920
40 atggtggatc cccggagcgc cagcggaggt gaccggatgt tccccggggt gcctttggac 1980
acgcacgacg tcttccagta ccgagagaaa gcctatttct gccaggaccg cttctactgg 2040
cgcgtgagtt cccggagtga gttgaaccag gtggaccaag tgggctacgt gacctatgac 2100
atcctgcagt gccctgagga ctag 2124

<210> 111

<211> 2019

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

<302> PKC alpha

<310> NM002737

<400> 111

55 atggctgacg ttttccggg caacgactcc acggcgtctc aggacgtggc caaccgcttc 60
gcccgcgaaag gggcgctgag gcagaagaac gtgcacgagg tgaaggacca caaatcctac 120
gcgcgcttct tcaagcagcc cacttcttgc agccactgca ccgacttcat ctgggggttt 180
60 gggaaacaag gcttccagtg ccaagtttgc tgttttgtgg tccacaagag gtgccatgaa 240
tttcttactt tttcttctcc ggggtgcggat aagggaccgc acactgatga cccagggagc 300
aagcacaagt tcaaaatcca cacttacgga agccccacct tctgcgatca ctgtgggtca 360
ctgctctatg gacttatcca tcaagggatg aaatgtgaca cctgcgatat gaacgttcac 420

	aagcaatgcg	tcataaatgt	ccccagcctc	tgcggaatgg	atcacactga	gaagagggggg	480
	cggatttacc	taaaggctga	ggttgctgat	gaaaagctcc	atgtcacagt	acgagatgca	540
	aaaaatctaa	cccctatgga	tccaaacggg	ctttcagatc	cttatgtgaa	gctgaaactt	600
	attcctgatc	ccaagaatga	aagcaagcaa	aaaaccaaaa	ccatccgctc	cacactaaat	660
5	ccgcagtggg	atgagtcctt	tacattcaaa	ttgaaacctt	cagacaaaaga	ccgacgactg	720
	tctgtagaaa	tctgggactg	ggatcgaaca	acaaggaatg	acttcatggg	atocctttcc	780
	tttgaggttt	oggagctgat	gaagatgccg	gccagtggat	ggtacaagtt	gcttaacca	840
	gaagaagggtg	agtactacaa	cgtacccatt	ccggaagggg	acgaggaagg	aaacatggaa	900
	ctcaggcaga	aattcgagaa	agccaaactt	ggccctgctg	gcaacaaagt	catcagttcc	960
10	tctgaagaca	ggaaacaacc	ttccaacaac	cttgaccgag	tgaaactcac	ggacttcaat	1020
	ttcctcatgg	tgttgggaaa	ggggagtttt	ggaaagggtga	tgcttgccga	caggaagggc	1080
	acagaagaac	tgtatgcaat	caaaatcctg	aagaaggatg	tggtgattca	ggatgatgac	1140
	gtggagtgc	ccatggtaga	aaagcgagtc	ttggccctgc	ttgacaaacc	cccgttcttg	1200
	acgcagctgc	actcctgctt	ccagacagtg	gatcggtgt	acttcgtcat	ggaatatgtc	1260
15	aacggtgagg	acctcatgta	ccacattcag	caagtaggaa	aatttaagga	accacaagca	1320
	gtattctatg	ggcagagat	ttccatcgga	ttgttctttc	ttcataaaaag	aggaatcatt	1380
	tatagggatc	tgaagttaga	taacgtcatg	ttggattcag	aaggacatat	caaaattgct	1440
	gactttggga	tgtgcaagga	acacatgatg	gatggagtca	cgaccaggac	cttctgtggg	1500
	actccagatt	atatcgcccc	agagataatc	gcttatcagc	cgtatggaaa	atctgtggac	1560
20	tggtgggcct	atggcgctcct	gttgtatgaa	atgcttgccg	ggcagcctcc	atctgtggt	1620
	gaagatgaag	acgagctatt	tcagtctatc	atggagcaca	acgtttccta	tccaaaatcc	1680
	ttgtccaagg	aggctgtttc	tatctgcaaa	ggactgatga	ccaaacaccc	agccaagcgg	1740
	ctgggctgtg	ggcctgaggg	ggagagggac	gtgagagagc	atgccttctt	ccggaggatc	1800
25	gactgggaaa	aactggagaa	cagggagatc	cagccaccat	tcaagcccaa	agtgtgtggc	1860
	aaaggagcag	agaactttga	caagttcttc	acacgaggac	agcccgtctt	aacaccacct	1920
	gatcagctgg	ttattgctaa	catagaccag	tctgattttg	aagggttctc	gtatgtcaac	1980
	ccccagtttg	tgcaccccat	cttacagagt	gcagtatga			2019
30	<210> 112						
	<211> 2022						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
35	<300>						
	<302> PKC beta						
	<310> X07109						
40	<400> 112						
	atggctgacc	cggtctgcgg	gccgcgcgcg	agcgagggcg	aggagagcac	cgtgcgcttc	60
	gcccgcgaaag	gcgcccctccg	gcagaagaac	gtgcatgagg	tcaagaacca	caaattcacc	120
	gcccgcgttct	tcaagcagcc	caccttctgc	agccactgca	ccgacttcat	ctggggcttc	180
	gggaagcagg	gattccagtg	ccaagtttgc	tgttttgttg	tgcaaaagcg	gtgccatgaa	240
45	tttgtcacat	tctcctgccc	tggtcgtgac	aaggggtccag	cctccgatga	ccccgcgagc	300
	aaacacaagt	ttaagatcca	cacgtactcc	agccccacgt	tttgtgacca	ctgtgggtca	360
	ctgctgtatg	gactcatcca	ccaggggatg	aaatgtgaca	cctgcatgat	gaatgtgcac	420
	aagcgctgcg	tgatgaatgt	tcccagcctg	tgtggcacgg	accacacgga	gcgcccgggc	480
	cgcactctaca	tccaggccca	catcgacagg	gacgtcctca	ttgtcctcgt	aagagatgct	540
50	aaaaaccttg	tacctatgga	ccccaatggc	ctgtcagatc	cctacgtaaa	actgaaactg	600
	attcccgatc	ccaaaagtga	gagcaaaacg	aagaccaaaa	ccatcaaatg	ctccctcaac	660
	cctgagtggg	atgagacatt	tagattttcag	ctgaaagaat	cggacaaaaga	cagaagactg	720
	tcagtagaga	tttgggattg	ggatttgacc	agcaggaatg	acttcatggg	atctttgtcc	780
	tttgggattt	ctgaacttca	gaaggccagt	gttgatggct	ggtttaagtt	actgagccag	840
55	gaggaaggcg	agtacttcaa	tgtgcctgtg	ccaccagaag	gaagtggagg	caatgaagaa	900
	ctgcggcaga	aatttgagag	ggccaagatc	agtcagggaa	ccaagggtcc	ggaagaaaag	960
	acgaccaaca	ctgtctccaa	atgtgacaac	aatggcaaca	gagaccggat	gaaactgacc	1020
	gatttttaact	tcctaattgg	gctggggaaa	ggcagctttg	gcaagggtcat	gcttttcagaa	1080
	cgaaaaggca	cagatgagct	ctatgctgtg	aagatccctga	agaaggacgt	tgtgatccaa	1140
60	cgatgatgac	tggagtgcac	tatggtggag	aagcgggtgt	tggtccctgcc	tgggaagccg	1200
	cccttcctga	ccagctccca	ctcctgtctc	cagaccatgg	accgcctgta	ctttgtgatg	1260
	gagtagctga	atgggggcca	cctcatgtat	cacatccagc	aagtcggccg	gttcaaggag	1320
	ccccatgctg	tatttttacgc	tgcagaaatt	gccatcggtc	tggttcttctt	acagagtaag	1380

	ggcatcattt accgtgacct aaaacttgac aacgtgatgc tcgattctga gggacacatc 1440
	aagattgccc attttggcat gtgtaaggaa aacatctggg atgggggtgac aaccaagaca 1500
	ttctgtggca ctccagacta catcgccccc gagataattg cttatcagcc ctatgggaag 1560
5	tccgtggatt ggtgggcatt tggagtcctg ctgtatgaaa tgttggctgg gcaggcacc 1620
	tttgaagggg aggatgaaga tgaactcttc caatccatca tggaaacaaa cgtagcctat 1680
	cccaagtcta tgtccaagga agctgtggcc atctgcaaag ggctgatgac caaacacca 1740
	ggcaaacgtc tgggttgtgg acctgaaggc gaacgtgata tcaaagagca tgcatttttc 1800
	cggatatattg attgggagaa acttgaacgc aaagagatcc agccccctta taagccaaaa 1860
10	gcttgtgggc gaaatgctga aaacttcgac cgatttttca cccgccatcc accagtccta 1920
	acacctccc accaggaagt catcaggaat attgaccaat cagaattcga aggattttcc 1980
	tttgtaact ctgaattttt aaaaccgaa gtcaagagct aa 2022
	<210> 113
15	<211> 2031
	<212> DNA
	<213> Homo sapiens
	<300>
20	<302> PKC delta
	<310> NM006254
	<400> 113
25	atggcgccgt tcctgcgcat cgccttcaac tcctatgagc tgggctccct gcaggccgag 60
	gacgaggcga accagccctt ctgtgccgtg aagatgaagg aggcgctcag cacagagcgt 120
	gggaaaacac tgggtgcagaa gaagccgacc atgtatcctg agtggaagtc gacgttcgat 180
	gcccacatct atgaggggag cgtcatccag attgtgctaa tgcgggcagc agaggagcca 240
	gtgtctgagg tgaccgtggg tgtgtcgggt ctggccgagc gctgcaagaa gaacaatggc 300
30	aaggctgagt tctggctgga cctgcagcct caggccaagg tgttgatgtc tgttcagtat 360
	ttcctggagg acgtggattg caaacaatct atgcgcagtg aggacgaggc caagttccca 420
	acgatgaacc gccgcggagc catcaaacag gccaaaatcc actacatcaa gaaccatgag 480
	tttatcgcca ccttcttttg gcaaccacc ttctgttctg tgtgcaaaga ctttgtcttg 540
	ggcctcaaca agcaaggcta caaatgcagg caatgtaacg ctgccatcca caagaaatgc 600
35	atcgacaaga tcatcggcag atgcaactgg accgcggcca acagccggga cactatattc 660
	cagaaagaac gcttcaacat cgacatgccg caccgcttca aggttcacaa ctacatgagc 720
	cccaccttct gtgaccactg cggcagcctg ctctggggac tgggtgaagca gggattaaag 780
	tgtgaagact cggcagtgaa tgtgcaccat aaatgccggg agaagggtggc caacctctgc 840
	ggcatcaacc agaagctttt ggctgaggcc ttgaaccaag tcaaccagag agcctccggg 900
40	agatcagact cagcctcttc agagcctgtt gggatatatc aggggttcga gaagaagacc 960
	ggagttgctg gggaggacat gcaagacaac agtgggacct acggcaagat ctgggagggc 1020
	agcagcaagt gcaacatcaa caacttcatc ttccacaagg tcttgggcaa aggcagcttc 1080
	gggaagggtgc tgcttgga gctgaagggc agaggagagt actctgccat caaggccctc 1140
	aagaaggatg tggctcctgat cgacgacgac gtggagtga ccatggttga gaagcgggtg 1200
45	ctgacacttg ccgcagagaa tccctttctc acccacctca tctgcacctt ccagaccaag 1260
	gaccacctgt tctttgtgat ggagttcttc aacggggggg acctgatgta ccacatccag 1320
	gacaaaggcc gctttgaact ctaccgtgcc acgttttatg ccgctgagat aatgtgtgga 1380
	ctgcagtttc tacacagcaa gggcatcatt tacagggacc tcaaactgga caatgtgtg 1440
	ttggaccggg atggccacat caagattgcc gactttggga tgtgcaaaga gaacatattc 1500
50	ggggagagcc gggccagcac cttctgcggc accctgact atatcgcccc tgagatccta 1560
	cagggcctga ggtacacatt ctctgtggac tgggtgtctt tcggggctct tctgtacgag 1620
	atgctcattg gccagtcctt cttccatggt gatgatgagg atgaactctt cgagtccatc 1680
	cgtgtggaca cgccacatta tccccgctgg atcaccaagg agtccaagga catcctggag 1740
	aagctctttt aaagggaacc aaccaagagg ctgggaatga cgggaaacat caaaatccac 1800
55	cccttcttca agaccataaa ctggactctg ctggaaaagc ggaggttggg gccacccttc 1860
	aggcccaaag tgaagtcacc cagagactac agtaactttg accaggagtt cctgacagag 1920
	aaggcgcgcc tctcctacag cgacaagaac ctcatcgact ccatggacca gtctgcattc 1980
	gctggcttct cctttgtgaa ccccaaattc gaggacctcc tggagattg a 2031
60	<210> 114
	<211> 2049
	<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>
<302> PKC eta
5 <310> NM006255

<400> 114
atgtcgtctg gcaccatgaa gttcaatggc tatttgaggg tccgcatcgg tgaggcagtg 60
gggctgcagc ccacccgctg gtccctgcgc cactcgtctt tcaagaaggg ccaccagctg 120
10 ctggacccct atctgacggt gagcgtggac caggtgcgcg tgggccagac cagcaccaag 180
cagaagacca acaaaccac gtacaacgag gagttttgcg ctaacgtcac cgacggcggc 240
cacctcgagt tggccgtctt ccacgagacc cccctgggct acgacttcgt ggccaactgc 300
accctgcagt tccaggagct cgctggcacg accggcgccct cggacacctt cgagggttg 360
gtggatctcg agccagaggg gaaagtattt gtggtaataa cccttaccgg gagtttctact 420
15 gaagctactc tccagagaga ccggatcttc aaacatttta ccaggaagcg ccaaagggct 480
atgcgaaggc gagtccacca gatcaatgga cacaagttca tggccacgta tctgaggcag 540
ccacactact gctctcactg cagggagttt atctggggag tgtttgggaa acagggttat 600
cagtgccaaag tgtgcacctg tgctgctccat aaacgctgcc atcatctaata tgttacagcc 660
tgtacttgcc aaaacaatat taacaaagtg gattcaaaga ttgcagaaca gaggttcggg 720
20 atcaacatcc cacacaagtt cagcatccac aactacaaag tgccaacatt ctgcgatcac 780
tgtggctcac tgctctgggg aataatgcga caaggacttc agtgtaaaat atgtaaaatg 840
aatgtgcata ttgatgtca agcgaacgtg gccctaact gtggggtaaa tgcgggtggaa 900
cttgccaaga ccttggcagg gatgggtctc caacccggaa atatttctcc aacctcgaa 960
25 ctctgtttcca gatcgaccct aagacgacag ggaaaggaga gcagcaaaga aggaaatggg 1020
attgggggtta attcttccaa ccgacttggt atcgacaact ttgagttcat ccgagtgttg 1080
gggaagggga gttttgggaa ggtgatgctt gcaagagtaa aagaaacagg agacctctat 1140
gctgtgaagg tgctgaagaa ggacgtgatt ctgctggatg atgatgtgga atgcaccatg 1200
accgagaaaa ggatcctgtc tctggcccgc aatcaccctt tcctcactca gttgttctgc 1260
30 tgctttcaga ccccgcgtcg tctgtttttt gtgatggagt ttgtgaatgg ggggtgactg 1320
atgttccaca ttcagaagtc tcgtcgtttt gatgaagcac gagctcgctt ctatgctgca 1380
gaaatcattt cggctctcat gttcctccat gataaaggaa tcactctatag agatctgaaa 1440
ctggacaatg tcctgttgga ccacgagggt cactgtaaac tggcagactt cggaatgtgc 1500
aaggagggga tttgcaatgg tgtcaccacg gccacattct gtggcacgcc agactatatc 1560
35 gctccagaga tcctccagga aatgctgtac gggcctgcag tagactgggt ggcaatgggc 1620
gtgttgctct atgagatgct ctgtggtcac gcgccttttg aggcagagaa tgaagatgac 1680
ctctttgagg ccatactgaa tgatgaggtg gtctacccta cctggctcca tgaagatgcc 1740
acagggatcc taaaatcttt catgaccaag aacccacca tgcgcttggg cagcctgact 1800
cagggaggcg agcacgccat cttgagacat ccttttttta aggaaatcga ctgggccag 1860
40 ctgaaccatc gccaaataga accgcctttc agaccagaa tcaaatcccg agaagatgtc 1920
agtaattttg accctgactt cataaaggaa gagccagttt taactccaat tgatgagga 1980
catcttccaa tgattaacca ggatgagttt agaaaacttt cctatgtgtc tccagaatgtg 2040
caaccatag 2049

45 <210> 115
<211> 948
<212> DNA
<213> Homo sapiens

50 <300>
<302> PKC epsilon
<310> XM002370

<400> 115
55 atgttggcag aactcaaggc caaagatgaa gtatatgctg tgaaggcttt aaagaaggac 60
gtcatccttc aggatgatga cgtggactgc acaatgacag agaagaggat tttggctctg 120
gcacggaaac accgtacct taccacatc tactgctgct tccagaccaa ggaccgctc 180
tttttcgtca tggaatatgt aaatgggtga gacctcatgt ttcagattca gcgctcccga 240
aaattcgacg agcctcgctt acggttctat gctgcagagg tcacatcggc cctcatgttc 300
60 ctccaccagc atggagtcac ctacagggat ttgaaactgg acaacatcct tctggatgca 360
gaaggctact gcaagctggc tgacttcggg atgtgcaagg aagggtattc gaatgggtgtg 420
acgaccacca cgttctgtgg gactcctgac tacatagctc ctgagatcct gcaggagtgtg 480

gagtatggcc cctccgtgga ctggtggggcc ctgggggtgc tgatgtacga gatgatggct 540
 ggacagcctc cctttgagggc cgacaatgag gacgacctat ttgagtccat cctccatgac 600
 gacgtgctgt acccagtctg gctcagcaag gaggctgtca gcatcttgaa agctttcatg 660
 5 acgaagaatc cccacaagcg cctgggctgt gtggcatcgc agaatggcga ggacgccatc 720
 aagcagcacc cattcttcaa agagattgac tgggtgctcc tggagcagaa gaagatcaag 780
 ccacccttca aaccacgcat taaaaccaa agagacgtca ataattttga ccaagacttt 840
 acccggaag agccggtact cacccttggtg gacgaagcaa ttgtaaagca gatcaaccag 900
 gaggaattca aaggttttctc ctacttttggg gaagacctga tgcctga 948

10 <210> 116
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <300>
 <302> PKC iota
 <310> NM002740

20 <400> 116
 atgtcccaca cggtcgcagg cggcggcagc ggggaccatt cccaccaggt cggggtgaaa 60
 gcctactacc gcggggatat catgataaca cattttgaac cttccatctc ctttgagggc 120
 ctttgcaatg aggttcgaga catgtgttct tttgacaacg aacagctctt caccatgaaa 180
 25 tggatagatg aggaaggaga cccgtgtaca gtatcatctc agttggagt agagaagcc 240
 tttagacttt atgagctaaa caaggattct gaactcttga ttcattgtgt cccttgtgta 300
 ccagaacgtc ctgggatgcc ttgtccagga gaagataaat ccatctaccg tagagggtgca 360
 cgccgtgga gaaagcttta ttgtgccaat ggccacactt tccaagccaa gcgtttcaac 420
 aggcgtgctc actgtgccat ctgcacagac cgaatatggg gacttggacg ccaaggatat 480
 aagtgcattca actgcaaaact cttggttcat aagaagtgcc ataaactcgt cacaattgaa 540
 30 tgtgggcggc attctttgcc acaggaacca gtgatgccc tggatcagtc atccatgcat 600
 tctgacctg cacagacagt aattccatat aatccttcaa gtcattgagag tttggatcaa 660
 gttggtgaag aaaaagaggc aatgaacacc agggaaagtg gcaaagcttc atccagtcta 720
 ggtcttcagg attttgattt gctccgggta ataggaagag gaagtattgc caaagtactg 780
 ttggttcgat taaaaaaaac agatcgtatt tatgcaatga aagttgtgaa aaaagagctt 840
 35 gttaatgatg atgaggatat tgattgggta cagacagaga agcatgtgtt tgagcaggca 900
 tccaatcatc ctttccttgt tgggctgcat tcttgctttc agacagaaag cagattgttc 960
 tttgttatag agtatgtaaa tggaggagac ctaatgtttc atatgcagcg acaaagaaaa 1020
 cttcctgaag aacatgccag attttactct gcagaaatca gtctagcatt aaattatctt 1080
 catgagcgag ggataattta tagagatttg aaactggaca atgtattact ggactctgaa 1140
 40 ggcacatta aactcactga ctacggcatg tgtaaggaaag gattacggcc aggagataca 1200
 accagcactt tctgtggtac tctaattac attgtcctg aaatttttaag aggagaagat 1260
 tatggtttca gtgttgactg gtgggctctt ggagtgtc tgtttgagat gatggcagga 1320
 aggtctccat ttgatattgt tgggagctcc gataaccctg accagaacac agaggattat 1380
 ctcttccaag ttattttgga aaaacaaatt cgcataccac gttctctgtc tgtaaaagct 1440
 45 gcaagtgttc tgaagagttt tcttaataag gaccctaagg aacgattggg ttgtcatcct 1500
 caaacaggat ttgctgatat tcagggacac ccgttcttcc gaaatgttga ttgggatatg 1560
 atggagcaaa aacaggtggt acctcccttt aaaccaaata tttctgggga atttggtttg 1620
 gacaactttg attctcagtt tactaatgaa cctgtccagc tcaactccaga tgacgatgac 1680
 attgtgagga agattgatca gtctgaattt gaagggtttt agtatatcaa tcctcttttg 1740
 50 atgtctgcag aagaatgtgt ctga 1764

<210> 117
 <211> 2451
 55 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> PKC mu
 60 <310> XM007234

<400> 117

	atgtatgata	agatcctgct	ttttcgccat	gaccctacct	ctgaaaacat	ccttcagctg	60
	gtgaaagcgg	ccagtgatat	ccaggaaggc	gatcttattg	aagtgggtctt	gtcagcttcc	120
	gccacctttg	aagactttca	gattcgtccc	cacgctctct	ttgttcattc	atacagagct	180
5	ccagctttct	gtgatcactg	tggagaaatg	ctgtgggggc	tgggtacgtca	aggtcttaaa	240
	tgtgaagggg	gtggctctgaa	ttaccataag	agatgtgcat	ttaaaatacc	caacaattgc	300
	agcgggtgtga	ggcggagaag	gctctcaaac	gtttccctca	ctgggggtcag	caccatccgc	360
	acatcatctg	ctgaactctc	tacaagtgcc	cctgatgagc	cccttctgca	aaaatcacca	420
	tcagagtcgt	ttattggctg	agagaagagg	tcaaattctc	aatcatacat	tggacgacca	480
10	attcaccttg	acaagatttt	gatgtctaaa	gttaaagtgc	cgcacacatt	tgtcatccac	540
	tcctacaccc	ggcccacagt	gtgccagtac	tgcaagaagc	ttctgaaggg	gcttttcagg	600
	cagggtctgc	agtgcгаааа	ttgcagattc	aactgccata	aacgttgtgc	accgaaagta	660
	ccaaacaact	gccttggcga	agtgaccatt	aatggagatt	tgcttagccc	tggggcagag	720
	tctgatgtgg	tcattggaaga	agggagtgat	gacaatgata	gtgaaaggaa	cagtgggctc	780
	atggatgata	tggagaagc	aatggtccaa	gatgcagaga	tggcaatggc	agagtgccag	840
15	aacgcacagt	gcgagatgca	agatccagac	ccagaccacg	aggacgcaa	cagaaccatc	900
	agtccatcaa	caagcaacaa	tatcccactc	atgagggtag	tgcagtctgt	caaacacacg	960
	aagaggaaaa	gcagcacagt	catgaaagaa	ggatggatgg	tccactacac	cagcaaggac	1020
	acgctgcgga	aacggcacta	ttggagattg	gatagcaaat	gtattaccct	ctttcagaat	1080
	gacacaggaa	gcaggtaact	caaggaaatt	cctttatctg	aaattttgtc	tctggaacca	1140
20	gtaaaaaact	cagctttaat	tcctaattggg	gccaatcctc	attgtttcga	aatcactacg	1200
	gcaaattgtag	tgtattatgt	gggagaaaat	gtggtcaatc	cttcacagccc	atcaccaaat	1260
	aacagtgttc	tcaccagtgg	cgttgggtgca	gatgtggcca	ggatgtggga	gatagccatc	1320
	cagcatgccc	ttatgcccgt	cattcccaag	ggctcctccg	tgggtacagg	aaccaacttg	1380
	cacagagata	tctctgtgag	tatttcagta	tcaaattgcc	agattcaaga	aaatgtggac	1440
25	atcagcacag	tatatcagat	ttttcctgat	gaagtactgg	gttctggaca	gtttggaatt	1500
	gtttatggag	gaaaacatcg	taaaacagga	agagatgtag	ctattaaaat	cattgacaaa	1560
	ttacgatttc	caacaaaaaca	agaaagccag	ccttcgtaatg	aggttgcaat	tctacagaac	1620
	cttcacacac	ctgggtgttg	aaatttggag	tgtatgtttg	agacgcctga	aagagtgttt	1680
30	gttggttatgg	aaaaactcca	tggagacatg	ctggaaatga	tcttgtcaag	tgaaaagggc	1740
	aggttgccag	agcacataac	gaagttttta	attactcaga	tactcgtggc	tttgcggcac	1800
	cttcattttta	aaaatatcgt	tcactgtgac	ctcaaaccag	aaaatgtgtt	gctagcctca	1860
	gctgatcctt	ttcctcaggt	gaaactttgt	gatttttggt	ttgcccggat	cattggagag	1920
	aagtcttttc	ggaggtcagt	ggtgggtacc	cccgttacc	tggctcctga	ggtcctaagg	1980
	aacaagggct	acaatcgctc	tctagacatg	tggtctgttg	gggtcatcat	ctatgtaagc	2040
35	ctaagcggca	cattcccatt	taatgaagat	gaagacatac	acgaccaa	tcagaatgca	2100
	gctttcatgt	atccaccaa	tccctggaag	gaaatatctc	atgaagccat	tgatcttata	2160
	aacaatttgc	tgcagtaaaa	aatgagaaag	cgctacagtg	tggataagac	cttgagccac	2220
	ccttggctac	aggactatca	gacctgggta	gatttgcgag	agctggaatg	caaaatcggg	2280
	gagcgtcata	taccccatga	aagtgatgac	ctgaggtggg	agaagtatgc	aggcgagcag	2340
40	gggctgcagt	accacacaca	cctgatcaat	ccaagtgcta	gccacagtga	cactcctgag	2400
	actgaagaaa	cagaaatgaa	agccctcggt	gagcgtgtca	gcatectatg	a	2451
	<210>	118					
45	<211>	2673					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
50	<302>	PKC nu					
	<310>	NM005813					
	<400>	118					
55	atgtctgcaa	ataattcccc	tccatcagcc	cagaagtctg	tattaccac	agctattcct	60
	gctgtgcttc	cagctgcttc	tccgtgttca	agtcctaaga	cgggactctc	tgcccagactc	120
	tctaattggaa	gcttctagtc	accatcactc	accaactcca	gaggctcagt	gcatacagtt	180
	tcattttctac	tgcaaatgtg	cctcacacgg	gagagtgtta	ccattgaagc	ccaggaactg	240
	tctttatctg	ctgtcaagga	tcttgtgtgc	tccatagttt	atcaaaaagt	tccagagtgt	300
	ggattctttg	gcatgtatga	caaaattctt	ctctttcgcc	atgacatgaa	ctcagaaaac	360
60	attttgcagc	tgattacctc	agcagatgaa	atacatgaag	gagacctagt	ggaagtgggt	420
	ctttcagctt	tagccacagt	agaagacttc	cagattcgctc	cacatactct	ctatgtacat	480
	tcttacaaag	ctcctacttt	ctgtgattac	tgtgttgaga	tgctgtgggg	attggtacgt	540

	caaggactga	aatgtgaagg	ctgtggatta	aattaccata	aacgatgtgc	cttcaagatt	600
	ccaaataact	gtagtggagt	aagaaagaga	cgtctgtcaa	atgtatcttt	accaggaccc	660
	ggcctctcag	ttccaagacc	cctacagcct	gaatatgtag	cccttcccag	tgaagagtca	720
5	catgtccacc	aggaaccaag	taagagaatt	ccttcttgga	gtggtcgccc	aatctggatg	780
	gaaaagatgg	taatgtgcag	agtgaaggtt	ccacacacat	ttgctgttca	ctcttacacc	840
	cgtccacaga	tatgtcagta	ctgcaagcgg	ttactgaaag	gcctctttcg	ccaaggaatg	900
	cagtgtaaag	attgcaaatt	caactgccat	aaacgctgtg	catcaaaagt	accaagagac	960
	tgcttggag	aggttacttt	caatggagaa	ccttccagtc	tgggaacaga	tacagatata	1020
	ccaatggata	ttgacaataa	tgacataaat	agtgatagta	gtcgggggtt	ggatgacaca	1080
10	gaagagccat	caccccaga	agataagatg	ttcttcttgg	atccatctga	tctcgatgtg	1140
	gaaagagatg	aagaagccgt	taaaacaatc	agttccatcaa	caagcaataa	tattccgcta	1200
	atgagggttg	tacaatccat	caagcacaca	aagaggaaga	gcagcacaa	ggtgaaggaa	1260
	gggtggatgg	tccattacac	cagcagggat	aacctgagaa	agaggcatta	ttggagactt	1320
	gacagcaaat	gtctaacatt	atttcagaat	gaatctggat	caaagtatta	taaggaaatt	1380
15	ccactttcag	aaattctcgg	catatcttca	ccacgagatt	tcacaaacat	ttcacaaggc	1440
	agcaatccac	actgttttga	aatcattact	gatactatgg	tatacttcgt	tggtgagaac	1500
	aatggggaca	gctctcataa	tcctgttctt	gctgccactg	gagttggact	tgatgtagca	1560
	cagagctggg	aaaaagcaat	tcgccaagcc	ctcatgcctg	ttactcctca	agcaagtgtt	1620
	tgcaacttctc	caggggcaagg	gaaagatcac	aaagatttgt	ctacaagtat	ctctgtatct	1680
20	aattgtcaga	ttcaggagaa	tgtggatatc	agtactgttt	accagatctt	tgcaagtgtg	1740
	gtgcttgggt	caggccagtt	tggcatcggt	tatggaggaa	aacatagaaa	gactgggagg	1800
	gatgtggcta	ttaaagtaat	tgataagatg	agattcccca	caaaacaaga	aagtcaactc	1860
	cgtaatgaag	tggctatttt	acagaatttg	caccatcctg	ggattgtaaa	cctggaatgt	1920
	atgtttgaaa	ccccagaacg	agtctttgta	gtaatggaaa	agctgcatgg	agatatgttg	1980
25	gaaatgattc	tatccagtga	gaaaagtcgg	cttccagaac	gaattactaa	attcatggtc	2040
	acacagatac	ttgttgcttt	gaggaatctg	cattttaaga	atattgtgca	ctgtgattta	2100
	aagccagaaa	atgtgctgct	tgcatcagca	gagccatttc	ctcaggtgaa	gctgtgtgac	2160
	tttggatttg	cacgcacat	tgggtgaaaag	tcattcagga	gatctgtggt	aggaactcca	2220
	gcatacttag	cccctgaagt	tctccggagc	aaagggttaca	accgttcctt	agatatgttg	2280
30	tcagtgggag	ttatcatcta	tgtgagcctc	agtggcacat	ttccttttaa	tgaggatgaa	2340
	gatataaatg	accaaattcca	aatgctgca	tttatgtacc	caccaaattcc	atggagagaa	2400
	atttctgggt	aagcaattga	tctgataaac	aatctgcttc	aagtgaagat	gagaaaacgt	2460
	tacagtgttg	acaaatctct	tagtcatccc	tggctacagg	actatcagac	ttggcttgac	2520
	cttagagaat	ttgaaactcg	cattggagaa	cgttacatta	cacatgaaag	tgatgatgct	2580
35	cgctgggaaa	tacatgcata	cacacataac	cttgtatacc	caaagcactt	cattatggct	2640
	cctaattccag	atgatatgga	agaagatcct	taa			2673
	<210> 119						
40	<211> 2121						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
45	<302> PKC tau						
	<310> NM006257						
	<400> 119						
	atgtcgccat	ttcttcggat	tggcttgtcc	aactttgact	gcggttcctg	ccagtcttgt	60
50	cagggcgagg	ctgttaaccc	ttactgtgct	gtgctcgtca	aagagtatgt	cgaatcagag	120
	aacgggcaga	tgtatatcca	gaaaaagcct	accatgtacc	caccctggga	cagcactttt	180
	gatgcccata	tcaacaaggg	aagagtcatt	cagatcattg	tgaaggcaa	aaacgtggac	240
	ctcatctctg	aaaccaccgt	ggagctctac	tcgctggctg	agaggtgcag	gaagaacaac	300
	gggaagacag	aaatatgggt	agagctgaaa	cctcaaggcc	gaatgcta	gaatgcaaga	360
55	tactttctgg	aaatgagtga	cacaaaggac	atgaatgaat	ttgagacgga	aggcttcttt	420
	gctttgcac	agcgccgggg	tgccatcaag	caggcaaaag	tccaccacgt	caagtgcctc	480
	gagttcactg	ccaccttctt	cccacagccc	acattttgct	ctgtctgcca	cgagtgtgtc	540
	tggggcctga	acaaacaggg	ctaccagtcg	cgacaatgca	atgcagcaat	tcacaagaag	600
	tgtattgata	aagttatagc	aaagtgcaca	ggatcagcta	tcaatagccg	agaaaccatg	660
60	ttccacaagg	agagattcaa	aattgcacatg	ccacacagat	ttaaagtcta	caattacaag	720
	agccccacct	tctgtgaaca	ctgtgggacc	ctgctgtggg	gactggcacg	gcaaggactc	780
	aagtgtgatg	catgtggcat	gaatgtgcat	catagatgcc	agacaaaggt	ggccaacctt	840

5 tgtggcataa accagaagct aatggctgaa ggcgtggcca tgattgagag cactcaacag 900
 gctcgtctgct taagagatac tgaacagatc ttcagagaag gtccgggttga aattgggtctc 960
 ccatgctcca tcaaaaatga agcaaggccg ccatgtttac cgacaccggg aaaaagagag 1020
 cctcagggga tttcctggga gtctccgttg gatgaggttg ataaaatgtg ccatcttcca 1080
 gaacctgaac tgaacaaaga aagaccatct ctgcagatta aactaaaaat tgaggatttt 1140
 atcttgacaca aaatgttggg gaaaggaaagt tttggcaagg tcttcctggc agaattcaag 1200
 aaaaccaatc aatttttctgc aataaaggcc ttaaagaaag atgtggtctt gatggacgat 1260
 gatgttgagt gcacgatggt agagaagaga gttctttcct tggcctggga gcatccgttt 1320
 ctgacgcaca tgttttgtac attccagacc aaggaaaacc tttttttgt gatggagtac 1380
 10 ctcaacggag gggacttaat gtaccacatc caaagctgcc acaagttcga cttttccaga 1440
 cgcacgtttt atgctgctga aatcattctt ggtctgcagt tccttcattc caaaggaata 1500
 gtctacaggg acctgaagct agataacatc ctgtaggaca aagatggaca tatcaagatc 1560
 gcggtttttg gaatgtgcaa ggagaacatg ttaggagatg ccaagacgaa taccttctgt 1620
 gggacacctg actacatcgc cccagagatc ttgctgggtc agaaatacaa ccactctgtg 1680
 15 gactggtggt ccttcggggg tctcctttat gaaatgtga ttggtcagtc gcctttccac 1740
 gggcaggatg aggaggagct cttccactcc atccgcagtg acaatccctt ttaccacagg 1800
 tggctggaga aggaagcaaa ggacctctc gtgaagctct tcgtgcgaga acctgagaag 1860
 aggctgggag tgaggggaga catccgccag caccctttgt ttcgggagat caactgggag 1920
 gaacttgaac ggaaggagat tgaccaccag ttccggccga aagtgaatc accatttgac 1980
 20 tgcagcaatt tcgacaaaga attcttaaac gagaagcccc ggctgtcatt tgccgacaga 2040
 gcactgatca acagcatgga ccagaatatg ttcaggaact tttccttcat gaaccccg 2100
 atggagcggc tgatatcctg a 2121

25 <210> 120
 <211> 1779
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <300>
 <302> PKC zeta
 <310> NM2744

35 <400> 120
 atgcccagca ggaccgaccc caagatggaa gggagcggcg gccgcgtccg cctcaaggcg 60
 cattacgggg gggacatctt catcaccagc gtggacgccc ccacgacctt cgaggagctc 120
 tgtgaggaag tgagagacat gtgtcgtctg caccagcagc acccgctcac cctcaagtgg 180
 gtggacagcg aaggtgaccc ttgcacgggtg tcctcccaga tggagctgga agaggctttc 240
 40 cgcttgcccc gtcagtgcag ggatgaaggc ctcatcttc atgttttccc gagcaccctc 300
 gagcagcctg gcctgccatg tccgggagaa gacaaatcta tctaccgccc gggagccaga 360
 agatggagga agctgtaccg tgccaacggc cacctcttcc aagccaagcg ctttaacagg 420
 agagcgtact gcggtcagtg cagcgagagg atatggggcc tcgcgaggca aggctacagg 480
 tgcatacaat gcaactgct ggtccataag cgctgccacg gcctcgtccc gctgacctgc 540
 aggaagcata tggattctgt catgccttcc caagagcctc cagtagacga caagaacgag 600
 45 gacgccgacc ttccttccga ggagacagat ggaattgctt acatttctc atcccgaag 660
 catgacagca ttaaagacga ctccggaggac cttaagccag ttatcgatgg gatggatgga 720
 atcaaaatct ctcaggggct tgggtgcag gactttgacc taatcagagt catcgggcgc 780
 gggagctacg ccaaggttct cctggtgcgg ttgaagaaga atgaccaa attacgccatg 840
 aaagtggatg agaaagagct ggtgcatgat gacgaggata ttgactgggt acagacagag 900
 50 aagcacgtgt ttgacagcg atccagcaac cccttctgg tcggattaca ctctgtctc 960
 cagacgacaa gtcggttgtt cctggtcatt cagtacgtca acggcgggga cctgattgtc 1020
 cacatgcaga ggcagaggaa gctccctgag gagcagcca gggtctacgc ggccgagatc 1080
 tgcatacggc tcaacttcct gcacgagagg gggatcatct acagggacct gaagctggac 1140
 aacgtcctcc tggatgcgga cgggcacatc aagctcacag actacggcat gtgcaaggaa 1200
 55 ggcctggggc ctggtgacac aacgagcatt ttctgcggaa ccccgaaata catcgcccc 1260
 gaaatcctgc gggagaggaa gtacgggtct agcgtggact ggtgggcgt gggagtctc 1320
 atgtttgaga tgatggccgg gcgtccccg ttccagatca tcaccgacaa cccggacatg 1380
 aacacagagg actacctttt ccaagtgatc ctggagaagc ccatccggat ccccggttc 1440
 ctgtccgtca aagcctccca tgttttaaaa ggatttttaa ataaggaccc caaagagagg 1500
 60 ctcggtgccc ggccacagac tggattttct gacatcaagt cccacgcgtt cttccgcagc 1560
 atagactggg acttgctgga gaagaagcag gcgtccctc cattccagcc acagatcaca 1620
 gacgactacg gtctggacaa ctttgacaca cagttcacca gcgagcccg gcagctgacc 1680

ccagacgatg aggatgccat aaagaggatc gaccagtcag agttcgaagg ctttgagtat 1740
 atcaacccat tattgctgtc caccgaggag tcggtgtga 1779

5 <210> 121
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <300>
 <302> VEGF
 <310> NM003376

<400> 121
 15 atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgccct tgctgtctcta cctccaccat 60
 gccaaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
 gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180
 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
 atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300
 20 aacatcacca tgcagattat gcggtcaca cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
 agcttccctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
 aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480
 tgtaaatgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540
 gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cgggtga 576

25 <210> 122
 <211> 624
 <212> DNA
 30 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> VEGF B
 <310> NM003377

35 <400> 122
 atgagccctc tgctccgccg cctgctgctc gccgcactcc tgcagctggc ccccgcccag 60
 gcccctgtct cccagcctga tgcccctggc caccagagga aagtgggtgc atggatagat 120
 gtgtatactc gcgtacctg ccagccccgg gaggtgggtg tgcccttgac tgtggagctc 180
 40 atgggcaccg tggccaaaca gctggtgccc agctgctgta ctgtgcagcg ctgtgggtggc 240
 tgctgccctg acgatggcct ggagtgtgtg cccactgggc agcaccaagt ccggatgacg 300
 atcctcatga tccggtaccc gagcagtcag ctgggggaga tgtccctgga agaacacagc 360
 cagtgtgaat gcagacctaa aaaaaaggac agtgcctgta agccagacag ggctgccact 420
 ccccaccacc gtccccagcc ccgttctgtt cggggctggg actctgcccc cggagcacc 480
 45 tccccagctg acatcaccca tcccactcca gcccaggcc cctctgcccc cgctgcacc 540
 agcaccacca gcgccctgac ccccggaact gccgcgccc ctgccgacgc cgcagcttcc 600
 tccgttgcca agggcggggc ttag 624

50 <210> 123
 <211> 1260
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55 <300>
 <302> VEGF C
 <310> NM005429

<400> 123
 60 atgcacttgc tgggcttctt ctctgtggcg tgttctctgc tcgccgctgc gctgctccc 60
 ggtcctcgcg aggcgcccgc cgccgcgcgc gccttcgagt ccggactcga cctctcggac 120
 ggaggagccc acgcgggcga ggccacggct tatgcaagca aagatctgga ggagcagtta 180

5 cgggtctgtgt ccagtgtaga tgaactcatg actgtactct accagaata ttggaaaatg 240
 tacaagtgtc agctaaggaa aggaggctgg caacataaca gagaacaggc caacctcaac 300
 tcaaggacag aagagactat aaaatttgct gcagcacatt ataatacaga gatcttgaaa 360
 agtattgata atgagtgagg aaagactcaa tgcattgccac gggagggtgtg tatagatgtg 420
 5 ggggaaggagt ttggagtcgc gacaaacacc ttctttaaac ctccatgtgt gtccgtctac 480
 agatgtgggg gttgctgcaa tagtgagggg ctgcagtgc tgaacaccag cagagctac 540
 ctacagcaaga cgttatttga aattacagtg cctctctctc aaggcccca accagtaaca 600
 atcagttttg ccaatcacac ttctgcccga tgcattgcta aactggatgt ttacagacaa 660
 gttcattcca ttattagacg ttccctgccca gcaacactac cacagtgtca ggcagcgaac 720
 10 aagacctgcc ccaccaatta catgtggaat aatcacatct gcagatgcct ggctcaggaa 780
 gattttatgt ttccctcgga tgctggagat gactcaacag atggattcca tgacatctgt 840
 ggaccaaaaca aggagctgga tgaagagacc tgctcagtg tctgcagagc ggggcttcgg 900
 cctgccagct gtggacccca caaagaacta gacagaaact catgccagt tgtctgtaaa 960
 aacaaactct tccccagcca atgtggggcc aaccgagaat ttgatgaaaa cacatgccag 1020
 15 tgtgtatgta aaagaacctg ccccgaaaat caaccctaa atcctggaaa atgtgcctgt 1080
 gaatgtacag aaagtccaca gaaatgcttg ttaaaaggaa agaagttcca ccacaaaca 1140
 tgcagctgtt acagacggcc atgtacgaac cgccagaagg cttgtgagcc aggattttca 1200
 tatagtgaag aagtgtgtcg ttgtgtccct tcatattgga aaagaccaca aatgagctaa 1260

20
 <210> 124
 <211> 1074
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25
 <300>
 <302> VEGF D
 <310> AJ000185

30
 <400> 124
 atattcaaaa tgtacagaga gtgggtagtg gtgaatgttt tcatgatgtt gtacgtccag 60
 ctggtgcagg gctccagtaa tgaacatgga ccagtgaagc gatcatctca gtccacattg 120
 gaacgatctg aacagcagat cagggctgct tctagtttgg aggaactact tcgaattact 180
 35 cactctgagg actggaagct gtggagatgc aggtcgaggc tcaaaagttt taccagtatg 240
 gactctcgct cagcatccca tgggtccact aggtttgcgg caactttcta tgacattgaa 300
 acactaaaag ttatagatga agaattgcaa agaactcagt gcagccctag agaaacgtgc 360
 gtggagggtg ccagtgcgct ggggaagagt accaacacat tcttcaagcc cccttgtgtg 420
 aacgtgttcc gatgtggtgg ctgttgcaat gaagagagcc ttatctgtat gaacaccagc 480
 40 acctcgtaaa ttccaaaca gctctttgag atatcagtgc ctttgacatc agtacctgaa 540
 ttagtgccctg ttaaagttgc caatcataca ggttgtaagt gcttgccaac agccccccgc 600
 catccatact caattatcag aagatccatc cagatccctg aagaagatcg ctgttcccat 660
 tccaagaaac tctgtcctat tgacatgcta tgggatagca acaaatgtaa atgtgttttg 720
 caggaggaaa atccacttgc tggaaacagaa gaccactctc atctccagga accagctctc 780
 tgtgggcccac acatgatgtt tgacgaagat cggttgcgagt gtgtctgtaa aacaccatgt 840
 45 cccaaagatc taatccagca ccccaaaaac tgcagttgct ttgagtgcga agaaagtctg 900
 gagacctgct gccagaagca caagctatct caccagacac cctgcagctg tgaggacaga 960
 tgcccccttc ataccagacc atgtgcaagt ggcaaaacag catgtgcaaa gcattgccgc 1020
 tttccaaagg agaaaagggc tgcccagggg cccacagacc gaaagaatcc ttga 1074

50
 <210> 125
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55
 <300>
 <302> E2F
 <310> M96577

60
 <400> 125
 atggccttgg ccggggcccc tgcgggcccc ccatgcgcgc cggcgctgga ggccctgctc 60
 ggggcccggc cgctgcggct gctcgactcc tcgcagatcg tcatcatctc cgccgcgcag 120


```

gacgccagcg ccccgccggc tcccaccggc cccggggcgc ccgccgccgg cccctgcgac 180
cctgacctgc tgctcttcgc cacaccgcag gcgccccggc ccacacccag tgcgccggg 240
cccgcgctcg gccgcccggc ggtgaagcgg aggttgacc tggaaactga ccatcagtac 300
5 ctggccgaga gcagtgggccc agctcggggc agaggccgcc atccaggaaa aggtgtgaaa 360
tccccggggg agaagtcacg ctatgagacc tactgaatc tgaccaccaa gcgcttcctg 420
gagctgctga gccactcggc tgacgggtgc gtcgacctga actgggctgc cgaggtgctg 480
aaggtgcaga agcggcgcat ctatgacatc accaacgtcc ttgagggcat ccagctcatt 540
gccaagaagt ccaagaacca catccagtgg ctgggcagcc acaccacagt gggcgctcggc 600
10 ggacggcttg aggggttgac ccaggacctc cgacagctgc aggagagcga gcagcagctg 660
gaccacctga tgaatatctg tactacgcag ctgcgcctgc tctccgagga cactgacagc 720
cagcgccctgg cctacgtgac gtgtcaggac cttcgtagca ttgcagaccc tgcagagcag 780
atgggttatgg tgatcaaagc cctcctgag accagctcc aagccgtgga ctcttcggag 840
aactttcaga tctcccttaa gagcaaacaa ggcccgatcg atgttttcct gtgccctgag 900
gagaccgtag gtgggatcag ccctgggaag accccatccc aggaggtcac ttctgaggag 960
15 gagaacaggg cactgactc tgccaccata gtgtcaccac caccatcacc tccccctca 1020
tccctcacca cagatccag ccagtctcta ctcagcctgg agcaagaacc gctgttgtcc 1080
cggatgggca gcctgcgggc tccgtggac gaggaccgcc tgtccccgct ggtggcggcc 1140
gactcgctcc tggagcatgt gcgggaggac ttctccggcc tctccctga ggagttcacc 1200
agcctttccc caccacga ggccctcgac taccacttcg gcctcgagga gggcgagggc 1260
20 atcagagacc tcttcgactg tgactttggg gacctaccc ccctggattt ctga 1314

<210> 126
<211> 166
25 <212> DNA
    <213> Human papillomavirus

    <300>
    <302> EBER-1
30 <310> Jo2078

    <400> 126
    ggacctacgc tgccctagag gttttgctag ggaggagacg tgtgtggctg tagccacccg 60
    tcccgggtac aagtccccggg tggtaggac ggtgtctgtg gttgtcttcc cagactctgc 120
35 tttctgccgt cttcgggtcaa gtaccagctg gtggtccgca tgtttt 166

    <210> 127
    <211> 172
40 <212> DNA
    <213> Hepatitis C virus

    <300>
    <302> EBER-2
45 <310> J02078

    <400> 127
    ggacagccgt tgccctagtg gtttcggaca caccgccaac gctcagtgcg gtgctaccga 60
    cccgaggtca agtccccggg gaggagaaga gaggcttccc gcctagagca ttgcaagtc 120
50 aggattctct aatccctctg ggagaagggt attcggttg tccgctattt tt 172

    <210> 128
    <211> 651
55 <212> DNA
    <213> Hepatitis C virus

    <300>
    <302> NS2
60 <310> AJ238799

    <400> 128

```

atggaccggg agatggcagc atcgtgcgga ggcgcggttt tcgtaggtct gatactcttg 60
 accttgtcac cgcactataa gctgttcctc gctaggctca tatggtggtt acaatatttt 120
 atcaccaggg ccgaggcaca cttgcaagtg tggatcccc ccctcaacgt tcggggggggc 180
 5 cgcgatgccg tcatcctcct cacgtgcgcg atccaccag agctaattct taccatcacc 240
 aaaatcttgc tcgccatact cgggccactc atggtgctcc aggctggtat aaccaaagtg 300
 ccgtacttcg tgcgcgcaca cgggctcatt cgtgcattgca tgctggtgcg gaaggttgct 360
 gggggtcatt atgtccaaat ggctctcatg aagttggcgg cactgacagg tacgtacgtt 420
 tatgaccatc tcacccact gcgggactgg gccacgcgg gcctacgaga ccttgcggtg 480
 10 gcagttgagc ccgtcgtctt ctctgatatg gagaccaagg ttatcacctg gggggcagac 540
 accgcggcgt gtggggacat catcttgggc ctgcccgtct ccgcccgcag ggggagggag 600
 atacatctgg gaccggcaga cagccttgaa gggcaggggt ggcgactcct c 651

<210> 129
 15 <211> 161
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C virus

<300>
 20 <302> NS4A
 <310> AJ238799

<400> 129
 25 gcacctgggt gctggtaggc ggagtcctag cagctctggc cgcgtattgc ctgacaacag 60
 gcagcgtggg cattgtgggc aggatcatct tgtccggaaa gccggccatc attcccgcaca 120
 gggaaagtcct ttaccgggag ttcgatgaga tggaagagtg c 161

<210> 130
 30 <211> 783
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C virus

<300>
 35 <302> NS4B
 <310> AJ238799

<400> 130
 40 gcctcacacc tcccttacat cgaacagggg atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag 60
 gcaatcgggt tgctgcaaac agccaccaag caagcggagg ctgctgctcc cgtggtggaa 120
 tccaagtggc ggaccctcga agccttctgg gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg 180
 atacaatatt tagcaggctt gtccactctg cctggcaacc ccgcatagc atcactgatg 240
 gcattcacag cctctatcac cagcccgtc accaccaac ataccctcct gtttaacatc 300
 45 ctgggggggat ggggtggcgc ccaacttgct cctcccagcg ctgcttctgc tttcgtaggc 360
 gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc ataggccttg ggaaggtgct tgtggatatt 420
 ttggcaggtt atggagcagg ggtggcaggc gcgctcgtgg cctttaaggc catgagcggc 480
 gagatgccct ccaccgagga cctggttaac ctactccctg ctatcctctc cctggcgccc 540
 ctagtctgct gggctcgtgtg cgcagcgata ctgcgtcggc acgtggggcc aggggagggg 600
 50 gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg ttcgcttcgc ggggtaacca cgtctcccc 660
 acgcactatg tgcctgagag cgacgtgca gcacgtgtca ctcatatcct ctctagtctt 720
 accatcactc agctgctgaa gaggcttcac cagtggatca acgaggactg ctccacgcca 780
 tgc 783

55 <210> 131
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C virus

60 <300>
 <302> NS5A
 <310> AJ238799

<400> 131
 5 tccggctcgt ggctaagaga tgtttgggat tggatatgca cgggtgttgac tgatttcaag 60
 acctgggtcc agtccaagct cctgccgcga ttgccgggag tcccccttctt ctcatgtcaa 120
 cgtgggtaca agggagtctg gcggggcgac ggcatcatgc aaaccacctg cccatgtgga 180
 gcacagatca ccggacatgt gaaaaacggg tccatgagga tcgtggggcc taggacctgt 240
 agtaacacgt ggcattggaac attccccatt aacgcgtaca ccacggggcc ctgcacgccc 300
 tccccggcgc caaattatct tagggcgctg tggcgggtgg ctgctgagga gtacgtggag 360
 10 gttacgcggg tgggggattt ccactacgtg acgggcatga ccactgacaa cgtaaagtgc 420
 ccgtgtcagg ttccggcccc cgaattcttc acagaagtgg atggggtgcg gttgcacagg 480
 tacgctccag cgtgcaaacc cctcctacgg gaggaggtca cattcctggt cgggctcaat 540
 caatacctgg ttgggtcaca gctcccatgc gagcccgaa cggacgtagc agtgctcact 600
 tccatgctca ccgacccctc ccacattacg gcggagacgg ctaagcgtag gctggccagg 660
 15 ggatctcccc cctccttggc cagctcatca gctagccagc tgtctgcgcc ttccttgaag 720
 gcaacatgca ctaccctgca tgactccccg gacgtgacc tcacgaggg caacctcctg 780
 tggcggcagg agatgggcgg gaacatcacc cgcgtggagt cagaaaataa ggtagtaatt 840
 ttggactctt tcgagccgct ccaagcggag gaggatgaga gggaagtatc cgttccggcg 900
 gagatcctgc ggaggtccag gaaattccct cgacgtagtc ccatatgggc acgcccggat 960
 20 tacaaccctc cactgttaga gtccctggaag gacccggact acgtccctcc agtggtacac 1020
 ggggtgtccat tgccgcctgc caaggccctc ccgataccac ctccacggag gaagaggacg 1080
 gttgtcctgt cagaatctac cgtgtcttct gccttggcgg agctcgccac aaagaccttc 1140
 ggcagctccg aatcgtcggc cgtcgacagc ggcacggcaa cggcctctcc tgaccagccc 1200
 tccgacgacg gcgacgcggg atccgacggt gactcgtact cctccatgcc ccccttgag 1260
 25 ggggagccgg gggatcccca tctcagcgac gggctcttgg ctaccgtaag cgaggaggct 1320
 agtgaggacg tcgtctgctg c 1341

<210> 132
 <211> 1772
 30 <212> DNA
 <213> Hepatitis C virus

<300>
 <302> NS5B
 35 <310> AJ238799

<400> 132
 40 tcgatgtcct acacatggac aggcgccttg atcacgccat gcgctgcgga ggaaaccaag 60
 ctgcccacat atgcactgag caactctttg ctccgtcacc acaacttggt ctatgtctaca 120
 acatctcgca gcgcaagcct gcggcagaag aagggtcacct ttgacagact gcaggtcctg 180
 gacgaccact accgggacgt gctcaaggag atgaaggcga aggcgtccac agttaaggct 240
 aaacttctat ccgtggagga agcctgtaag ctgacgcccc cacattcggc cagatctaaa 300
 tttggctatg gggcaaagga cgtccggaac ctatccagca aggcggttaa ccacatccgc 360
 45 tccgtgtgga aggacttgct ggaagacact gagacaccaa ttgacaccac catcatggga 420
 aaaaatgagg ttttctgcgt ccaaccagag aagggggggc gcaagccagc tcgccttatc 480
 gtattcccag atttgggggt tcgtgtgtgc gagaaaatgg ccctttacga tgtggtctcc 540
 accctccctc aggcctgat gggctcttca tacggattcc aatactctcc tggacagcgg 600
 gtcgagttcc tgggtgaatgc ctggaaagcg aagaaatgcc ctatgggctt cgcataatgac 660
 acccgctggt ttgactcaac ggtcactgag aatgacatcc gtgttgagga gtcaatctac 720
 50 caatgtttgt acttggcccc cgaagccaga caggccataa ggtcgctcac agagcggctt 780
 tacatcgggg gccccctgac taattctaaa gggcgagaact gcggctatcg ccggtgccgc 840
 gcgagcgggt tactgacgac cagctgcggg aataccctca catgttactt gaaggccgct 900
 gcggcctgtc gagctgcgaa gctccaggac tgcacgatgc tcgtatgcgg agacgacctt 960
 gtcgttatct gtgaaagcgc ggggacccaa gaggacgagg cgagccctac ggccctcacg 1020
 55 gaggctatga ctagatactc tgcccccttg ggggacccgc ccaaaaccaga atacgacttg 1080
 gagttgataa catcatgctc ctccaatgct tcagtcgcgc acgatgcac tggaagaggt 1140
 gtgtactatc tcaccctgta cccaccaccc ccccttgcgc gggctgcgtg ggagacagct 1200
 agacacactc cagtcaatc ctggctaggg aacatcatca tgtatgcgcc caccttgtgg 1260
 60 gcaaggatga tcctgatgac tcatttcttc tccatccttc tagctcagga acaacttgaa 1320
 aaagccctag attgtcagat ctacgggggc tgttactcca ttgagccact tgacctacct 1380
 cagatcattc aacgactoca tggccttagc gcattttcac tccatagtta ctctccagg 1440
 gagatcaata ggggtggcttc atgcctcagg aaacttgggg taccgcccct gcgagctctg 1500

agacatcggg ccagaagtgt ccgcgctagg ctactgtccc aggggggggag ggctgccact 1560
 tgtggcaagt acctcttcaa ctgggcagta aggaccaagc tcaaactcac tccaatcccg 1620
 gctgcgtccc agttggattt atccagctgg ttcgttgctg gttacagcgg gggagacata 1680
 tatcacagcc tgtctcgtgc ccgaccccg cgtgttcatgt ggtgcctact cctactttct 1740
 5 gtaggggtag gcatctatct actccccaac cg 1772

<210> 133
 <211> 1892
 10 <212> DNA
 <213> Hepatitis C virus

<300>
 <302> NS3
 15 <310> AJ238799

<400> 133
 cgctattac ggcctactcc caacagacgc gaggcctact tggctgcatc atcactagcc 60
 tcacaggccg ggacaggaac caggctcgagg gggagggtcca agtgggtctcc accgcaacac 120
 20 aatcttttct ggcgacctgc gtcaatggcg tgtgttgagc tgtctatcat ggtgccggct 180
 caaagaccct tgccggccca aaggggccaa tcacccaaat gtacaccaat gttggaccagg 240
 acctcgtcgg ctggcaagcg cccccgggg cgcgttcctt gacaccatgc acctgcccga 300
 gctcggacct ttacttggtc acgaggcatg ccgatgtcat tccggtgcgc cggcggggcg 360
 25 acagcagggg gaggcctactc tccccaggg ccgtctccta cttgaagggc tcttcggggc 420
 gtccactgct ctgcccctcg gggcacgctg tgggcatctt tcgggctgcc gtgtgcaccc 480
 gagggggttg gaaggcggtg gactttgtac ccgtcgagtc tatggaaacc actatgcggt 540
 ccccggtctt cagggacaac tcgtcccttc cggccgtacc gcagacattc cagggtggccc 600
 atctacacgc ccctactggt agcggcaaga gcactaaggt gccggctgcg tatgcagccc 660
 aagggtataa ggtgcttgct ctgaaccgt ccgtcgccgc caccctaggt ttcggggcgt 720
 30 atatgtctaa ggcacatggt atcgacccta acatcagaac cggggtaagg accatcacca 780
 cgggtgcccc catcacgtac tccacctatg gcaagtttct tgccgacggt ggttgctctg 840
 ggggcgccta tgacatcata atatgtgatg agtgccactc aactgactcg accactatcc 900
 tgggcatcgg cacagtccctg gaccaagcgg agacggctgg agcgcgactc gtcgtgctcg 960
 ccaccgctac gcctccggga tcgggtcacc tgccacatcc aaacatcgag gagggtggctc 1020
 35 tgtccagcac tggagaaatc cccttttatg gcaaagccat ccccatcgag accatcaagg 1080
 gggggaggca cctcattttc tgccattcca agaagaaatg tgatgagctc gccgcgaagc 1140
 tgtccggcct cggactcaat gctgtagcat attaccgggg ccttgatgta tccgtcatac 1200
 caactagcgg agacgtcatt gtcgtagcaa cggacgctct aatgacgggc tttaccggcg 1260
 atttcgactc agtgatcgac tgcaatacat gtgtcaccga gacagtgcac ttcagcctgg 1320
 40 acccgacctt caccattgag acgacgaccg tgccacaaga cgcggtgtca cgctcgagc 1380
 ggcgaggcag gactggtagg ggcaggatgg gcatttacag gtttgtgact ccaggagAAC 1440
 ggccctcggg catgttcgat tccctcggtc tgtgcgagtg ctatgacgcg ggctgtgctt 1500
 ggtacgagct cagccccggc gagacctcag ttaggttgcg ggcttaccta aacacaccag 1560
 45 ggttgcccgt ctgccaggac catctggagt tctgggagag cgtctttaca ggcctcacc 1620
 acatagacgc ccatttcttg tcccagacta agcaggcagg agacaacttc ccctacctgg 1680
 tagcatacca ggctacggtg tgcgccaggg ctcaggctcc acctccatcg tgggacccaa 1740
 tgtggaagtg tctcatacgg ctaaagccta cgtgcacgg gccaacgccc ctgctgtata 1800
 ggctgggagc cgttcaaaac gaggttacta ccacacaccc cataacccaa tacatcatgg 1860
 50 catgcatgtc ggctgacctg gaggtcgtca cg 1892

<210> 134
 <211> 822
 <212> DNA
 55 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> stmn cell factor
 <310> M59964

60 <400> 134
 atgaagaaga cacaaacttg gattctcact tgcatttatc ttcagctgct cctatttaaat 60

5 cctctcgtca aaactgaagg gatctgcagg aatcgtgtga ctaataatgt aaaagacgtc 120
 actaaattgg tggcaaatct tccaaaagac tacatgataa ccctcaaata tgtccccggg 180
 atggatgttt tgccaagtca ttgttgata agcgagatgg tagtacaatt gtcagacagc 240
 ttgactgata ttctggacaa gttttcaaat atttctgaag gcttgagtaa ttattccatc 300
 atagacaaac ttgtgaatat agtcgatgac cttgtggagt gcgtcaaaga aaactcatct 360
 aaggatctaa aaaaatcatt caagagccca gaaccaggc tctttactcc tgaagaattc 420
 tttagaattt ttaatagatc cattgatgcc ttcaaggact ttgtagtggc atctgaaact 480
 agtgattgtg tggtttcttc aacattaagt cctgagaaag attccagagt cagtgtcaca 540
 aaaccattta tgttaccccc tgttgagacc agctccctta ggaatgacag cagtagcagt 600
 10 aataggaagg ccaaaaatcc ccctggagac tccagcctac actgggcagc catggcattg 660
 ccagcattgt tttctcttat aattggcttt gcttttggag ccttatactg gaagaagaga 720
 cagccaagtc ttacaagggc agttgaaaat atacaaatta atgaagagga taatgagata 780
 agtatgttgc aagagaaaga gagagagttt caagaagtgt aa 822

15 <210> 135
 <211> 483
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <300>
 <302> TGFalpha
 <310> AF123238

25 <400> 135
 atgggtcccct cggctggaca gctcgccctg ttcgctctgg gtattgtgtt ggctgcgtgc 60
 caggccttgg agaacagcac gtccccgctg agtgcagacc cgcccggtggc tgcagcagt 120
 gtgtcccatt ttaatgactg cccagattcc cactcagc tctgcttcca tggaaacctgc 180
 aggtttttgg tgcaggagga caagccagca tgtgtctgcc attctgggta cgttgggtgca 240
 30 cgctgtgagc atgctggacct cctggccgtg gtggctgcca gccagaagaa gcaggccatc 300
 accgccttgg tgggtgtctc catcgtggcc ctggctgtcc ttatcatcac atgtgtgtctg 360
 atacctgct gccaggtccg aaaacactgt gagtgggtgcc gggccctcat ctgccggcac 420
 gagaagccca gcgccctcct gaaggggaaga accgcttgct gccactcaga aacagtgggtc 480
 tga 483

35 <210> 136
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

40 <300>
 <302> GD3 synthase
 <310> NM003034

45 <400> 136
 atgagcccct gcgggcgggc ccggcgacaa acgtccagag gggccatggc tgtactggcg 60
 tggaaagttcc cgcggacccg gctgcccatt ggagccagt ccctctgtgt cgtgggtctc 120
 50 tgttggtctc acatcttccc cgtctaccgg ctgcccacag agaaagagat cgtgcagggg 180
 gtgctgcaac agggcacggc gtggaggagg aaccagaccg cggccagagc gttcaggaaa 240
 caaatggaag actgctgcca ccctgcccatt ctctttgcta tgactaaaat gaattcccct 300
 atggggaaga gcatgtggta tgacggggag tttttatact cattcaccat tgacaattca 360
 acttactctc tcttcccaca ggcaacccca ttccagctgc cattgaagaa atgcgcggtg 420
 gtgggaaatg gtgggattct gaagaagagt ggctgtggcc gtcaaataga tgaagcaaat 480
 55 tttgtcatgc gatgcaatct ccctcctttg tcaagtgaat acactaagga tgttggtacc 540
 aaaagtcagt tagtgacagc taatcccagc ataattcggc aaaggtttca gaacbtctctg 600
 tgggtccagaa agacatttgt ggacaacatg aaaatctata accacagtta catctacatg 660
 cctgcctttt ctatgaagac aggaacagag ccatctttga gggtttatta tacactgtca 720
 gatgttggtg ccaatcaaac agtgctgttt gccaaaccca actttctgct tagcattgga 780
 60 aagttctgga aaagttaggg aatccatgcc aagcgctgt ccacaggact tttcttggtg 840
 agcgcagctc tgggtctctg tgaagaggtg gccatctatg gcttctggcc cttctctgtg 900
 aatatgcatg agcagcccat cagccaccac tactatgaca acgtcttacc cttttctggc 960

ttccatgccca tgccccgagga atttctccaa ctctggtatc ttcataaaat cgggtgcactg 1020
agaatgcagc tggacccatg tgaagatacc tcactccagc ccacttccta g 1071

5 <210> 137
<211> 744
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <300>
<302> FGF14
<310> NM004115

<400> 137
15 atggccgcgg ccacgcctag cggcttgatc cgccagaagc ggcaggcgcg ggagcagcac 60
tgggaccggc cgtctgccag caggaggcgg agcagcccca gcaagaaccg cgggctctgc 120
aacggcaacc tgggtggatat cttctccaaa gtgcgcatct tcggcctcaa gaagcgagg 180
ttgcggcgcc aagatcccca gctcaagggg atagtgaacca gggttatattg caggcaaggc 240
tactacttgc aaatgcaccc cgtatggagct ctcgatggaa ccaaggatga cagcactaat 300
20 tctacactct tcaacctcat accagtggga ctacgtgttg ttgccatcca gggagtga 360
acagggttgt atatagccat gaatggagaa gggtacctct acccatcaga actttttacc 420
cctgaatgca agtttaaaga atctgttttt gaaaattatt atgtaatcta ctcatccatg 480
ttgtacagac aacaggaatc tggtagagcc tgggttttgg gattaaataa ggaagggcaa 540
gctatgaaag ggaacagagt aaagaaaacc aaaccagcag ctcattttct acccaagcca 600
25 ttggaagtgg ccatgtaccg agaaccatct ttgcatgatg ttggggaaac ggtcccgaag 660
cctgggggtga cgccaagtaa aagcacaagt gcgtctgcaa taatgaatgg aggcaaacca 720
gtcaacaaga gtaagacaac atag 744

30 <210> 138
<211> 1503
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus

35 <300>
<302> gag (HIV)
<310> NC001802

<400> 138
40 atgggtgcca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaacata tagtatgggc aagcaggag 120
ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttgaaacat cagaaggctg tagacaaata 180
ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240
acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300
45 ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgagaa catccagggg 420
caaatggtac atcaggccat atcacctaga acttttaaag catgggtaaa agtagtagaa 480
gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540
ccacaagatt taaacacat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600
50 ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcattc agtgcaatg 660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720
agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaataatc cacctatccc agtaggagaa 780
atttataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840
agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccggttc 900
55 tataaaactc taaagccga gcaagcttca caggaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
ttgttgggtcc aaaaatgcgaa ccagattgt aagactatct taaaagcatt gggaccagcg 1020
gctacactag aagaaatgat gacagcatgt caggagtag gaggaccggg ccataaggca 1080
agagtttttg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140
ggcaatttga ggaaccaaag aaagattgtt aagtgtttca attgtggcaa agaagggcac 1200
60 acagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aagggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320
tacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380

gagagcttca ggtctgggggt agagacaaca actccccctc agaagcagga gccgatagac 1440
 aaggaactgt atcctttaac ttccctcagg tcactctttg gcaacgaccc ctcgtcacaa 1500
 taa 1503

5
 <210> 139
 <211> 1101
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus

10
 <300>
 <302> TARBP2
 <310> NM004178

15
 <400> 139
 atgagtgaag aggagcaagg ctccggcact accacgggct gcgggctgcc tagtatagag 60
 caaatgctgg ccgccaaccc aggcaagacc ccgatcagcc ttctgcagga gtatgggacc 120
 agaataggga agacgcctgt gtacgacctt ctcaaagccg agggccaagc ccaccagcct 180
 aattttcaoct tccgggtcac cggttggcgac accagctgca ctgggtcaggg cccagcaag 240
 20 aaggcagcca agcacaaggc agctgaggtg gccctcaaac acctcaaagg ggggagcatg 300
 ctggagccgg ccctggagga cagcagttct ttttctcccc tagactcttc actgcctgag 360
 gacattccgg tttttactgc tgcagcagct gctaccccag ttccatctgt agtcctaacc 420
 aggagcccc ccattggaact gcagccccct gtctcccctc agcagctctga gtgcaacccc 480
 gttgggtgctc tgcaggagct ggtggtgcag aaaggctggc ggttgccgga gtacacagtg 540
 25 acccaggagt ctgggcccagc ccaccgcaaa gaattcacca tgacctgtcg agtggagcgt 600
 ttcataggaga ttgggagtgg cacttccaaa aaattggcaa agcggaatgc ggcggccaaa 660
 atgctgcttc gagtgcacac ggtgcctctg gatgcccggg atggcaatga ggtggagcct 720
 gatgatgacc acttctccat tgggtggggc ttccgcctgg atggtcttcg aaaccggggc 780
 ccagggttga cctgggattc tctacgaaat tcagtaggag agaagatcct gtccctccgc 840
 30 agttgtctccc tgggctccct ggggtgccctg ggccctgcct gctgccgtgt cctcagttag 900
 ctctctgagg agcaggcctt tcacgtcagc tacctggata ttgaggagct gagcctgagt 960
 ggactctgcc agtgccctggg ggaactgtcc acccagccgg ccactgtgtg tcatggctct 1020
 gcaaccacca gggaggcagc ccgtggtgag gctgcccgcc gtgccctgca gtacctcaag 1080
 atcatggcag gcagcaagtg a 1101

35
 <210> 140
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus

40
 <300>
 <302> TAT (HIV)
 <310> U44023

45
 <400> 140
 atggagccag tagatcctag cctagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaagact 60
 gcttgtacca cttgctattg taaagagtgt tgctttcatt gccaaagtttg ttccataaca 120
 aaaggcttag gcactctcta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag aactcctcaa 180
 50 ggtcatcaga ctaatcaagt ttctctatca aagcagtaa 219

55
 <210> 141
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

60
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sense-Strang
 (R1A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1-Sequenz
 ist

<400> 141
ccaucucgaa aagaaguuaa ga 22

5 <210> 142
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R1B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

15 <400> 142
ucuuaacuuc uuuucgagau ggggu 24

20 <210> 143
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R2A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1- Sequenz
ist

30 <400> 143
uauagguucc aggcugcug ua 22

35 <210> 144
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R3A) einer dsRNA, die homolog zur Sequenz des MDR
1-Gens ist

45 <400> 144
ccagagaagg ccgcaccugc au 22

50 <210> 145
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R3B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

60 <400> 145
augcaggugc ggccuucucu ggcu 24

<210> 146
<211> 21

<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R4A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1-Sequenz
ist

10 <400> 146
ccaucucgaa aagaaguuaa g 21

15 <210> 147
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R4B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

25 <400> 147
uaacuucuuu ucgagauggg u 21

30 <210> 148
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(S1A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw.
GFP-Sequenz ist

40 <400> 148
ccacaugaag cagcagcacu uc 22

45 <210> 149
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

50 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S1B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

55 <400> 149
gaagucgugc ugcuucaugu gg 22

60 <210> 150
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S7A) einer dsRNA, die homolog

zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

5 <400> 150
ccacaugaag cagcacgacu u 21

<210> 151
<211> 21
<212> RNA
10 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S7B) einer dsRNA, die
15 komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

<400> 151
gucgugcugc uucauguggu c 21

20 <210> 152
<211> 24
<212> RNA
25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R2B) einer dsRNA, die
30 komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

<400> 152
uacagcaagc cuggaaccua uagc 24

35 <210> 153
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(K1A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
Neomycin-Sequenz ist

45 <400> 153
acaggaugag gaucguuucg ca 22

50 <210> 154
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (K1B) einer dsRNA, die
komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

<400> 154
60 ugcgaaacga uccucauccu gu 22

5 <210> 155
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(K3A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
Neomycin-Sequenz ist

<400> 155
gaugaggauc guuucgcaug a 21

15 <210> 156
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (K3B) einer dsRNA, die
komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

25 <400> 156
augcgaaacg auccucaucc u 21

30 <210> 157
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(K2A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
Neomycin-Sequenz ist

40 <400> 157
acaggagag gaucguuucg caug 24

45 <210> 158
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

50 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (K2B) einer dsRNA, die
komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

55 <400> 158
ugcgaaacga uccucauccu gucu 24

60 <210> 159
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S4B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP-bzw. GFP-Sequenz ist

5 <400> 159
gaagucgugc ugcucaugu gguc 24

10 <210> 160
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(PKC1 A) einer dsRNA, die homolog zur
Proteinkinase C-Sequenz ist

20 <400> 160
cuucuccgcc ucacaccgu gcaa 24

25 <210> 161
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (PKC2 B) einer dsRNA, die
komplementär zur Proteinkinase C-Sequenz ist

35 <400> 161
gcagcggugu gagcgaggaga ag 22

40 <210> 162
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S12B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

50 <400> 162
aagucgugcu gcucaugug g 21

55 <210> 163
<211> 23
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

60 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S11B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

<400> 163
aagucgugcu gcucaugug guc 23

	<210> 164	
	<211> 20	
5	<212> RNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
10	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang (S13A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist	
	<400> 164	
15	ccacaugaag cagcacgacu	20
	<210> 165	
	<211> 22	
	<212> RNA	
20	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
25	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: antisense-Strang (S13B) einer dsRNA, die komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist	
	<400> 165	
	agucgugcug cuucaugugg uc	22
30	<210> 166	
	<211> 20	
	<212> RNA	
35	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
40	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: antisense-Strang (S14B) einer dsRNA, die komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist	
	<400> 166	
	agucgugcug cuucaugugg	20
45	<210> 167	
	<211> 24	
	<212> RNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
50	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang (S4A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist	
55	<400> 167	
	ccacaugaag cagcacgacu ucuu	24
60	<210> 168	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Künstliche Sequenz	

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-7A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

<400> 168
aacaccgcag caugucaaga u 21

<210> 169
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-7B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

<400> 169
cuugacaugc ugcgguguuu u 21

<210> 170
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-8A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

<400> 170
aaguuaaaaau ucccguccgu au 22

<210> 171
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-8B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

<400> 171
ugauagcgac gggaaauuuua ac 22

<210> 172
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-2A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

<400> 172
agugugaucc aagcuguccc aa

5 <210> 173
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-5B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

15 <400> 173
uugggacagc uuggaucaca cuuu

22

24

TRANSLATION FROM GERMAN

(12) WORLD ORGANIZATION OF INTELLECTUAL PROPERTY INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED PURSUANT TO THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Organization for Intellectual Property International Office			
(43) International Publication Date:	PCT	(10) International Publication Number:	
18 July 2002		WO 02/055693 A2	
(51) International Patent Classification: C12N 15/11		LIMMER,	Stephan
(21) International Application Number: PCT/EP02/00152		[GERMANY/GERMANY];	
(22) International filing date: 9 January 2002		Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth	
(25) Submission language German		(GERMANY). ROST, Sylvia	
(26) Publication language German		[GERMANY/GERMANY];	
(30) Priority data:		Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth	
101 00 586.5 9 January 2001 GERMANY		(GERMANY). HADWIGER, Philipp	
101 55 280.7 26 October 2001 GERMANY		[GERMANY/GERMANY; Universitätsstrasse	
101 58 411.3 29 November 2001 GERMANY	(74)	30, 95447 Bayreuth (GERMANY).	
101 60 151.4 7 December 2001 GERMANY		Attorneys: GASSNER, Rolfgang;	
(71) Applicant: (for all designated states, except US):		Nägelsbachstrasse 49a, 91052 Erlangen	
RIBOPHARMA AG		(GERMANY).	
[GERMANY/GERMANY]; Universitätsstrasse		(81) Designated states (national): AE, AG,	
30, 95447 Bayreuth (GERMANY).		AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,	
		BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,	
		DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,	
(72) Inventor and		GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP,	
(75) Inventor/Applicant (for US only): KREUTZER,		KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,	
Roland [GERMANY/GERMANY];		MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,	
Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth		OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,	
(GERMANY).		SK, SL, TJ, TM, TRADENAME, TR, TT, TZ,	
		UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.	

(84) Regional states (*regional*): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI Patent (BR, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

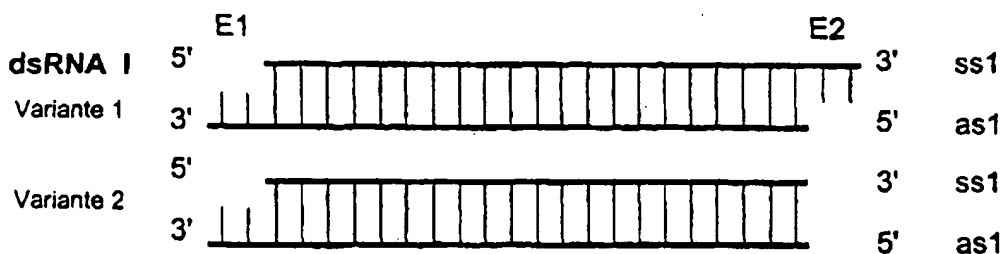
– without International Search Report and republished on receipt of the report

Refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette for explanation of the two-letter codes and other abbreviations..

(54) Title: **METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE**

(57) Abstract

The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 – 4 nucleotides.



Variant 1

Variant 2

METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

The invention concerns a method, an application and a medicament for inhibition of expression of a target gene.

Methods to inhibit expression of genes of medical or biotechnological interest by means of a double-strand ribonucleic acid (dsRNA) are known from WO 99/32619 and WO 00/44895. The known methods are highly effective. But there is also a requirement to further increase their efficiency.

The task of the present invention is to eliminate the shortcomings according to the prior art. In particular, a method, an application and a medicament are to be offered, with which even more efficient inhibition of expression of the target gene is attainable.

This task is solved by the features of Claims 1, 41 and 81. Advantageous embodiments are apparent from the features of Claims 2 to 40, 42 to 80 and 82 to 120.

With the features claimed according to the invention, a drastic increase in the effectiveness of inhibition of expression of the target gene in vitro and in vivo is surprisingly achieved. By the special design of the ends of the dsRNA, both their efficiency in mediating the inhibiting effect on expression of the target gene and their stability can be deliberately influenced. By increasing the stability, the effective concentration in the cell is increased.

Target gene according to the invention is understood to mean the DNA strand of the double-strand DNA in the cell that is complementary to a DNA strand, including all transcribed regions that serve for transcription as matrix. The target gene is therefore generally the "sense" strand. The one strand or anti-sense strand (as1) can be complementary to an RNA transcript formed during expression of the target gene or its processing product, for example, an mRNA. Insertion is understood to mean uptake in the cell. Uptake can occur by the cell itself; it also can be mediated by auxiliaries or aids. "Overhang" is understood to mean a terminal single-strand overhang that does not have paired nucleotides, according to Watson and Crick. "Double-strand

structure" is understood to mean a structure, in which the nucleotides of the individual strands are essentially paired according to Watson and Crick. A double-strand structure in the context of the present invention can also have individual mismatches.

According to a particularly advantageous embodiment, the dsRNA I has the overhang on the 3' end of one strand or the anti-sense strand as1 and/or on the 3' end of the other end or sense strand ss1. The dsRNA I can also be formed smoothly on one end. In this case, the smooth end is advantageously situated on the side of dsRNA I that has the 5' end of one strand (anti-sense strand; as1). In this form, the dsRNA I, on the one hand, has very good efficiency and, on the other hand, high stability in a living organism. The overall in vivo efficiency is excellent. The overhang is expediently formed from 1 to 4 nucleotides, preferably from 1 or 2 nucleotides.

According to another embodying feature, the efficiency of the method can be further increased if at least one additional dsRNA II, formed according to the dsRNA I according to the invention, is inserted into the cell, in which the one strand or at least a section of one strand of the double-strand structure of dsRNA I is complementary to a first region of the sense strand of the target gene, and in which an additional strand or at least a section of the additional strand of the double-strand structure of the additional dsRNA II is complementary to a second region of sense strand of the target gene. Inhibition of expression of the target gene is significantly increased in this case. The first and second region can overlap in sections, abut each other, or also be spaced from each other.

It has also proven advantageous if the dsRNA I and/or the additional dsRNA II have a length of less than 25 consecutive nucleotide pairs. A length in the range between 19 and 23 nucleotide pairs has proven to be particularly effective. The efficiency can be further increased if single-strand overhangs of 1 to 4 nucleotides are present on the double strands preferably formed from 19 to 23 nucleotide pairs.

The target gene, according to an additional embodying feature, can have the sequences SQ001 to SQ140, given in the enclosed sequence protocol. It can also be chosen from the following groups: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes for expression of

angiogenesis-inducing molecules, adhesion molecules and cell surface receptors. genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules, as well as genes for expression of the EGF receptors. The target gene can be the MDR1 gene, in particular. In this context, one of the existing sequences SQ141-173 or a combined dsRNA I/II from antisense (as) and sense sequences (ss) that go together can be used.

According to an additional advantageous embodying feature, expression is inhibited according to the principle of RNA interference.

The target gene is expediently expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia. It can be a component of a virus or viroid, especially a human pathogenic virus or viroid. The virus or viroid can also be an animal or plant pathogenic virus or viroid.

According to another embodying feature, it is prescribed that the unpaired nucleotides be substituted by nucleoside thiophosphates.

At least one end of the dsRNA I/II can be modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation in the individual strand. Advantageously, cohesion caused by the complementary nucleotide pairs of the double-strand structure is increased by at least one chemical length. The chemical length can be formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination. It has also proven expedient and to increase stability if the chemical link is formed in the vicinity of one end. Additional advantageous embodiments with respect to chemical linking can be deduced from the features of Claims 24 to 30, without requiring a further explanation for this.

The dsRNA I/II can be incorporated particularly easily in the cell if it is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes. It has also proven advantageous for transport of dsRNA I/II into the cell that it is bonded to at least a viral sheath protein, originating from a virus, derived from a virus or synthetically produced, associated with the sheath protein or

enclosed by it. The sheath protein can be derived from polyoma virus. The sheath protein can contain, in particular, the virus protein 1 and/or the virus protein 2 of polyoma virus. According to another embodiment, it is prescribed that, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side face the interior of the capsid or capsid-like structure. It is also advantageous that the one strand of dsRNA I/II (as1/2) is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene. The cell can be a vertebrate cell or a human cell.

It has also been found that the dsRNA I/II can advantageously be administered already in an amount of, at most, 5 mg/kg of body weight per day to a mammal, preferably a human. Even in this low dose, an excellent efficiency is achieved.

It has surprisingly been found that the dsRNA I/II can be taken up in a buffer solution for administration and then administered orally or by injection or infusion intravenously, intratumorally, by inhalation or intraperitoneally.

The use of a double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) to inhibit expression of a target gene in the cell is also proposed according to the invention, in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (anti-sense strand; as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the sense strand of the target gene, and in which the dsRNA I has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides on at least one end.

According to an additional stipulation of the invention, a medicament for inhibiting the expression of a target gene in a cell is proposed, containing a double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) in an amount sufficient to inhibit expression of a target gene, in which the dsRNA I has a double-strand structure from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the sense strand of target gene, and in which the dsRNA I has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides on at least one end.

The preceding comments are referred to for the further advantageous embodiment of dsRNA I/II.

The invention is further explained on an example below, with reference to the drawings and practical examples. In the drawings:

- Fig. 1a, b schematically depicts a first and second double-strand RNA and
- Fig. 2 schematically depicts a target gene,
- Fig. 3 depicts relative YFP fluorescence after application of different dsRNA in NIH/3T3 cells (first experiment),
- Fig. 4 shows relative YFP fluorescence after application of different dsRNA in NIH/3T3 cells (second experiment),
- Fig. 5 shows relative YFP fluorescence after application of different dsRNA in NIH/3T3 cells (third experiment),
- Fig. 6 shows relative YFP fluorescence after application of different dsRNA in NIH/3T3 cells (fourth experiment),
- Fig. 7 shows relative YFP fluorescence after application of different dsRNA in HeLa-S3 cells (fifth experiment),
- Fig. 8 shows fluorescence micrographs of NIH/3T3 cells after transfection with pcDNA-YFP and after cotransfection with pcDNA-YFP and different dsRNAs,
- Fig. 9 shows fluorescence micrographs of HeLa-S3 cells after transfection with pcDNA-YFP and after cotransfection with pcDNA-YFP and different dsRNAs,
- Fig. 10 shows gel electrophoretic separation of S1 after incubation in mouse serum,

- Fig. 11 shows gel electrophoretic separation of S1 after incubation in human serum,
- Fig. 12 shows gel electrophoretic separation of S7 after incubation in mouse serum,
- Fig. 13 shows gel electrophoretic separation of S7 after incubation in human serum,
- Fig. 14 shows gel electrophoretic separation of K3 after incubation in mouse serum,
- Fig. 15 shows gel electrophoretic separation of PKC1/2 after incubation in mouse serum,
- Fig. 16 shows gel electrophoretic separation of S1A/S4B after incubation in human serum,
- Fig. 17 shows gel electrophoretic separation of K2 after incubation in human serum and
- Fig. 18 shows GFP-specific immunoperoxidase staining on kidney paraffin sections of transgenic GFP mice,
- Fig. 19 shows GFP-specific immunoperoxidase staining on heart paraffin sections of transgenic GFP mice,
- Fig. 20 shows GFP-specific immunoperoxidase staining on pancreas paraffin sections transgenic GFP mice,
- Fig. 21 shows Western blot analysis of GFP expression in plasma,
- Fig. 22 shows Western blot analysis of GFP expression in the kidneys,
- Fig. 23 shows Western blot analysis of GFP expression in the heart,
- Fig. 24 shows Western blot analysis of EGFR expression in U-87 MG glioblastoma cells,

- Fig. 25a shows Northern blot analysis of the MDRI mRNA levels in colon carcinoma cell line LS174T, in which the cells were harvested after 74 hours,
- Fig. 25b shows quantification of the band according to Fig. 25a, in which the averages from two values are shown,
- Fig. 26a shows Northern blot analysis of the MDRI mRNA levels in colon carcinoma cell line LS174T, in which the cells were harvested after 48 hours,
- Fig. 26b shows quantification of the band according to Fig. 26a, in which the average values from the two values are shown,
- Fig. 27 shows a comparative depiction of a transmitted light and fluorescence photomicrograph of a transfection with 175 nM dsRNA (sequence R1 in Table 4).

The double-strand ribonucleic acids dsRNA I and dsRNA II, depicted schematically in Figures 1a and 1b, each have a first end E1 and a second end E2. The first and second ribonucleic acids dsRNA I/dsRNA II have single-strand sections formed from about 1 to 4 unpaired nucleotides on their two ends E1 and E2. Two possible variants are shown (variants 1 and 2), in which variant 2 has a smooth end (E2). The smooth ends, however, can also lie on the other end (E1) in another variant.

A target gene situated on DNA is schematically shown in Fig. 2. The target gene is made recognizable by a black bar. It has a first region B1 and a second region B2.

Each strand of the first dsRNA I (as1) and the second dsRNA II (as2) is complementary to the corresponding region B1 or B2 on the target gene.

Expression of the target gene is then inhibited with particular efficiency, if the dsRNA I/dsRNA II has single strand sections on its ends E1, E2. The single-strand sections can be formed both on

strand as1 or as2 and on the counterstrand (ss1 or ss2) or on strand as1, as2 and on the counterstrand.

The regions B1 and B2, as shown in Fig. 2, can be spaced from each other. However, they can also be adjacent to each other or overlap.

I. Inhibition of Expression of the YFP Gene in Fibroblasts:

Double-strand RNAs (dsRNAs) were prepared from sequences of the yellow fluorescent protein (YFP), a variant of the GFP (green-fluorescent protein) of the alga *Aequoria victoria* and microinjected into fibroblasts, together with a YFP-coding plasmid. Fluorescence reduction was then evaluated relative to cells without dsRNA.

Experimental Protocol:

By means of an RNA synthesizer (type Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and ordinary chemical methods, the RNA single strands apparent from the sequence protocols SQ148, 149 and SQ159 and the single strands complementary to them were synthesized. Purification then occurred by HPLC. Hybridization of the single strands to a double-strand occurred by heating the stoichiometric mixture of single strands in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 100 mM NaCl, to 90°C and subsequent cooling over 6 hours to room temperature. The dsRNAs so obtained were microinjected into the test cell.

The murine fibroblast cell line NIH/3T3, ECACC no. 930615624 (European Collection of Animal Cell Cultures) served as test system for these cell culture experiments. The plasmid pcDNA-YFP was used for microinjections, which contained an 800 bp large Bam HI/Eco RI-YFP fragment in the corresponding restriction cleavage sites of the vector pcDNA3. Expression of YFP was investigated under the influence of simultaneously cotransfected sequence-homologous dsRNA. Evaluation occurred under the fluorescence microscope, at the earliest, 3 hours after injection, with reference to green fluorescence.

Preparation of the Cell Cultures:

Cultivation of the cells occurred in DMEM with 4.5 g/L glucose, 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin (100 IU/100 µg/mL, Biochrom) in an incubator under a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The cells underwent passage every 3 days, in order to keep them in the exponential growth phase. A day before performance of transfection, the cells were trypsinized (10 × trypsin/TEDTA, Biochrom) and inoculated with a cell density of 0.73×10^5 cells into coated petri dishes (CORNING® Cell Culture Dish, 35 mM, Corning Inc., Corning, USA). The petri dishes were incubated with 0.2% gelatin (Biochrom) for at least 30 minutes at 37°C, washed once with PBS and immediately used for seeding of the cells. To permit recovery of individual cells, CELLocate coverslips from the Eppendorf company were used (square size 55 µm).

Microinjection:

To perform microinjection, the petri dishes were removed from the incubator for about 10 minutes. About 50 cells were microinjected per dish and batch (FemtoJet; Mikromanipulator 5171, Eppendorf). Glass capillaries (FemtoTip) from the Eppendorf company with a tip inside diameter of 0.5 µm were used for microinjection. The injection time was 0.8 seconds and the pressure 30 hPa. The microinjections were conducted on an Olympus IX50 microscope with a fluorescence device. 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.0, was used as injection buffer, which contains 0.01 µg/mL pcDNA-YFP. To check successful microinjection, 0.08% (w/v) Dextran-70000 coupled Texas-Red (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) was added to the injection solution. To investigate inhibition of the YFP expression with specific dsRNA, dsRNAs were added to the injection solution: batch 1: 0.1 µM dsRNA (sequence protocol SQ148/149); batch 2: 0.1 µM dsRNA (sequence protocol SQ148/159); batch 3: without RNA. After microinjection, the cells were incubated for at least three more hours in the incubator. The intracellular YFP fluorescence was then evaluated on the microscope: simultaneously red and green-fluorescent cells: microinjection was successful, no inhibition of YFP expression by dsRNA was observed; or control cells were involved, in which no dsRNA were injected; only red fluorescent cells: microinjection was successful, the dsRNA inhibits YFP expression.

Results:

At a dsRNA concentration of 0.1 μ M, a significantly increased inhibition or expression of the YFP gene in fibroblasts could be observed during use of dsRNA with the protruding single-strand regions (sequence protocol SQ148/159) on both 3' ends by two nucleotides each, in comparison with dsRNA without protruding single-strand ends (Table 1).

The use of short dsRNA molecules, containing 19-25 base pairs with overhangs of a few, preferably 1 to 3, non-base-paired, single-strand nucleotides, therefore permits comparatively stronger inhibition of gene expression in mammal cells than the use of dsRNAs with the same number of base pairs without the corresponding single-strand overhangs at the same RNA concentration.

Batch	Name	Sequence protocol number	0.1 μ M
1	S1A/ S1B	SQ148 SQ149	+
2	S1A/ S4B	SQ148 (protruding end) SQ159	+++
3		without RNA	-

Table 1: The symbols show the relative percentage of non-fluorescent or weakly green fluorescent cells (+++ > 90%; ++ 60-90%; + 30-60%; - < 10%).

II. Inhibition of Gene Expression with Target Gene in Cultivated HELA-S3 Cells and Mouse Fibroblasts by dsRNA:

The efficiency of inhibition of YFP expression after transient transfection of a YFP-coding plasmid based on RNA interference with dsRNAs can be modulated by the configuration of the 3' ends in the length of the base-paired regions.

Practical Example:

To detect the efficiency of dsRNA during specific inhibition of gene expression, transiently transfected NIH/3T3 cells (fibroblasts from NIH Swiss mouse embryo, ECCAC (European Collection of Animal Cell Cultures) no. 93061524) and HELA-S3 (human cervical carcinoma cells, DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) no. ACC 161) were used. The plasmid pcDNA-YFP was used for transfection, which contains an 800 bp Bam HI/Eco RI-YFP fragment in the corresponding cleavage sites of the vector pcDNA3. Double-strand RNAs derived from the sequence of the yellow fluorescent protein (YFP) were produced and transiently transfected with the plasmid pcDNA-YFP in the fibroblasts (the employed specific dsRNAs are complementary in their anti-sense strands to the corresponding sections of the gene sequences above YFP and GFP). After 48 hours, the fluorescence reduction was quantified. Cells that were transfected either only with pcDNA-YFP or with pcDNA-YFP and a controlled dsRNA (not derived from the YFP sequence) functioned as controls.

Experimental Protocol:

dsRNA Synthesis:

By means of an RNA synthesizer (type Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), and ordinary chemical methods, the RNA individual strands apparent from the sequence protocols and the single strands complementary to them were synthesized. Purification of the crude synthesis products then occurred by means of HPLC. The column NucleoPac PA-100, 9 × 250 mM, from the Dionex company was used; 20 mM tris, 10 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile as low salt buffer and 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile as high salt buffer. The flow rate was 3 mL/minute. Hybridization of the single strands to a double strand occurred by heating the stoichiometric mixture of the single strands in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 100 mM NaCl, to 80-90°C and subsequent slow cooling over 6 hours to room temperature.

Seeding of the Cells:

All cell culture work was conducted under sterile conditions in a corresponding work bench (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus). Cultivation of NIH/3T3 cells and HELA-S3 occurred in an incubator (CO₂ incubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) at 37°C, 5% CO₂ and saturated atmospheric humidity in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom), for the mouse fibroblasts, and Ham's F12 for the HELA cells with 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-glutamine (Biochrom) and penicillin/streptomycin (100 IU/100 µg/mL, Biochrom). In order to keep the cells in the exponential growth phase, the cells underwent passage every 3 days. 24 hours before the forming transfection, the cells were trypsinized (10 × trypsin/EDTA, Biochrom, Germany) and seeded with a cell density of 1.0×10^4 cells/recess into a 96-well plate (Multiwell dishes 96-well flat bottom, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µL growth medium.

Performance of Transient Transfection:

Transfection was conducted with Lipofectamine PlusTM reagent (Life Technologies) according to the information of the manufacturer. 0.15 µg pcDNA-YFP plasmid was introduced per well. The total transfection volume was 60 µL. 3-fold samples were used in each case. Plasmid DNA was first complexed, together with dsRNA. For this purpose, the plasmid DNA and the dsRNA were diluted in a serum-free medium and 1 µL PLUS reagent was used per 0.1 µg plasmid DNA (in a volume of 10 µL) and, after mixing for 15 minutes at room temperature, they were incubated. During incubation, 0.5 µL Lipofectamine was diluted in a total of 10 µL serum-free medium per 0.1 µg plasmid DNA, thoroughly mixed, added to the plasmid/dsRNA/PLUS mixture and incubated for another 15 minutes. During incubation, a medium change was conducted. For this purpose, the cells were washed once with 200 µL serum-free medium and then with 40 µL serum-free medium and then incubated further in the incubator, up to addition of DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine. After addition of 20 µL DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine per well, the cells were incubated for 2.5 hours in the incubator. After incubation, the cells were then washed once with 200 µL growth medium and incubated for 24 hours until detection of the fluorescence in 200 µL growth medium in the incubator.

Detection of Fluorescence:

24 hours after the last medium change, the fluorescence of the cells was photographed on the fluorescence microscope (IX50-S8F2, fluorescence unit U-ULS100Hg, burner U-RFL-T200, Olympus) with a USH-I02D mercury lamp (USHIO Inc., Tokyo, Japan), equipped with a WIB fluorescence cube and a digital CCD camera (Orca IIIIm, Hamamatsu and C4742-95 camera controller). Evaluation of the fluorescence recording occurred with the analysis software 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Germany). In order to relate the YFP fluorescence to cell density, a cell nucleus staining was carried out (Hoechst staining). For this purpose, the cells were first fixed for 5 in 100 μ L methylcarnoy (75% methanol, 25% glacial acetic acid) and then again for 10 minutes in methylcarnoy. After air drying, the fixed cells were incubated for 30 minutes in the dark with 100 μ L per well of Hoechst die (75 ng/mL). After washing twice with PBS (PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} , M^{2+} , Biochrom), the Hoechst-stained cells were photographed under the fluorescence microscope (Olympus, WU fluorescence cube for Hoechst).

Figures 3 to 9 show the results on inhibition of YFP expression by dsRNA in the cultivated cells:

The effects of YFP-specific dsRNAs and control dsRNAs on YFP expression in NIH/3T3 mouse fibroblasts after transient transfection are summarized in Figures 3, 4, 5 and 6. The experiments were run as described in the experimental protocol. The concentration of dsRNA refers to the concentration in the medium during the transfection reaction. The designations for the dsRNAs can be gathered from Table 2. The relative fluorescence per image section in area percent is shown. 3 different image sections were evaluated per well. The averages are obtained from the 3-fold batches.

The specific inhibition of YFP gene expression by dsRNAs in HELA-S3 cells is shown in Figures 7 and 9. The inhibiting effect of differently configured dsRNA constructs (Table 2) in different concentrations on expression of YFP in HELA cells is shown in Fig. 7. Fig. 8 shows representative fluorescence microscope recordings of NIH/3T3 mouse fibroblasts transiently transfected with YFP without dsRNA and with dsRNA specifically directed against YFP ($\times 100$ magnification).

8A: YFP controls

8B: S1, 10 nM

8C: S4, 10 nM
8D: S7, 10 nM
8E: S7/S11, 1 nM
8F: S7/S12, 1 nM

Fig. 9 shows representative fluorescence microscope recordings of HELA-3S cells transiently transfected with YFP without dsRNA and with dsRNAs specifically directed against YFP ($\times 100$ magnification).

9A: K2-controls, 10 nM
9B: S1, 10 nM
9C: S4, 10 nM
9D: S7, 10 nM
9E: S7/11, 1 nM
9F: S7/12, 1 nM
9G: S1A/S4B, 10 nM
9H: YFP controls

Results:

Fig. 3 shows that YFP expression after transient cotransfection of mouse fibroblasts with the YFP plasmid and dsRNAs specifically directed against the YFP sequence is inhibited with particular efficiency when the 3' ends of the regions containing 22 and 19 base pairs of the dsRNAs have single-strand sections of two nucleotides (nt). Whereas the dsRNA S1 with smooth 3' ends at a concentration of 1 nM (referred to the concentration in the cell culture medium during performance and transfection) exhibits no inhibiting effect on YFP expression, the dsRNAs S7 (19 nucleotide pairs) and S4 (24 nucleotide pairs), each with 2 nt overhangs on both 3' ends, inhibit the YFP expression by 50 or by 70% in comparison with the corresponding control dsRNAs K3 and K2. At a concentration of 10 nM, the dsRNA denoted S1 with smooth ends inhibits YFP expression by about 65%, whereas inhibition of YFP expression by the dsRNA S4 is about 94% (Fig. 4). The inhibiting effects of the dsRNAs denoted S4 and S7 is concentration-dependent (Figures 3 and 4, see also Fig. 7).

Fig. 4 shows that, for efficient suppression of YFP gene expression, the single-strand structure is not necessary on both 3' ends (on the sense and anti-sense strand). To achieve the most effective possible inhibition of YFP expression, only the 2 nt overhang on the 3' end is necessary on the anti-sense strand. Inhibition of YFP expression at a concentration of 1 nM in the two dsRNAs S4 (with 2 nt overhangs on both 3' ends) and S1A/S4B (with the 2 nt overhang on the 3' end of the anti-sense strand) lies at about 70%. On the other hand, if the 2 nt overhang is situated on the 3' end of the sense strand (and the 3' end of the anti-sense strand carries no single-strand region), inhibition of YFP gene expression is only 50%. Similarly, inhibition at higher concentrations is much better, if at least the 3' end of the anti-sense strand carries a 2 nt overhang.

A more distinct inhibition of YFP expression is achieved, if the base-paired region has 21 nucleotide pairs instead of 22 (S1 and S4), 20 (S13 and S13/14) or 19 (S7) (Figures 5, 6 and 7). Inhibition of YFP expression by S1 (22 base pairs with smooth ends) in a concentration of 5 nM is about 40%, whereas inhibition by S7/S12 (21 base pairs with smooth ends), also with 5 nM, lies at about 92%. If the dsRNA with 21 base pairs also has a 2 nt overhang on the anti-sense strand 3' end (S7/S11), inhibition lies at ~ 97% (compared with ~ 73% inhibition with S4 and ~ 70% inhibition with S7).

III. Investigation of Serum Stability of Double-Strand RNA (dsRNA):

The objective is to increase the effectiveness found the cell cultures of inhibition of gene expression of target genes mediated by dsRNA for use in vivo. This is achieved by improved stability of the dsRNAs in serum and by an extended residence time of the molecule in the circulation and the increased effective concentration of the functional molecules related to this, resulting from improved stability.

Practical Example:

The serum stability of dsRNAs that inhibit GFP expression was tested in vivo in murine and human serum.

Experimental Protocol:

Incubation with human or murine serum with the corresponding dsRNA occurred at 37°C. 85 µL serum was incubated with 15 µL 100 µM dsRNA. After specified incubation times (30 minutes, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h), the samples were frozen at -80°C. dsRNA without serum (+ 85 µL ddH₂O) and dsRNA at time 0 were used as control.

For isolation of the dsRNA from the incubation charge, which occurred on ice, 400 µL with 0.1% SDS was added to the charges and these are subjected to phenol extraction: 500 µL phenol:chloroform:isoamyl alcohol (IAA, 25:24:1, Roti®-Phenol, Roth, Karlsruhe) was added per charge and vortexed for 30 seconds at the highest stage (Vortex Genie-2; Scientific Industries). After 10 minutes of incubation on ice, phase separation occurred by centrifuging at 12,000 × g, 4°C for 10 minutes (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). The upper aqueous phase (about 200 µL) was taken off and subjected first to DNase I and the proteinase K digestion: addition of 20 µL 10-fold DNase I buffer (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) and 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 minutes incubation at 37°C, addition of 6 U DNase I again and incubation for another 20 minutes at 37°C, addition of 5 µL proteinase K (20 mg/mL, 04-1075, Peqlab, Germany) and 30 minutes incubation at 37°C. Phenol extraction was then conducted. For this purpose, 500 µL phenol:chloroform:IAA (25:24:1) was added, vortexed at the highest stage for 30 seconds, 10 minutes for 12000 × g, 4°C, centrifuged, the supernatant taken off and mixed in succession with 40 µL 3M Na-Ac (sodium acetate), pH 5.2, and 1 mL 100% EtOH, mixed thoroughly in the meantime and precipitated for at least 1 hour at -80°C. The precipitate was pelletized by centrifuging at 12000 × g for 30 minutes and 4°C, washed with 70% EtOH and recentrifuged (10 minutes, 12000 × g, 4°C). The air dried pellet was taken up in 30 µL RNA gel application buffer (7 M urea, 1 × TBE (0.09 M tris-borate, 0.002 M EDTA

(ethylenediaminetetraacetate), 0.02% (w/v) bromophenol blue, 0.02% (w/v) xylene cyanol) and stored at -20°C until gel application.

For characterization of the dsRNA, an analytical, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (analytical PAGE) was conducted. The urea gels were prepared right before the run: 7 M urea (21 g) was dissolved during agitation in 25 mL 40% aqueous acrylamide/bisacrylamide stock solution (Rotiphoresis gel, A515.1, Roth) and 5 μ L 10 \times TBE (100 g Tris, 55 g boric acid, 9.3 g EDTA per L distilled water) and made up to 50 μ L with distilled water. Right before pouring, 50 μ L TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) and 500 μ L 10% APS (ammonium peroxodisulfate) were added. After polymerization, the gel was introduced to a vertical electrophoresis apparatus (Merck, Darmstadt) and a prerun was conducted for 30 minutes at a constant 40 mA current intensity. As run buffer, 1 \times TBE buffer was used. Before application onto the gel, the RNA samples were heated for 5 minutes at 100°C, cooled on ice and centrifuged for 20 seconds in a table-top centrifuge (Eppendorf, minispin). 15 μ L was applied to the gel. The run occurred for about 2 hours at a constant current of 40 mA. After the run, the gel was stained for 30 minutes at RT (room temperature) with Stains all stain solution (20 mL Stains all stock solution dissolved in 200 mL formamide) mixed with 200 mL distilled water and 180 mL formamide) and the background staining eliminated after rinsing in distilled water for 45 minutes. The gels were photographed with the photo documentation system Image Master VDS from Pharmacia.

Figures 10 to 17 show the serum stability of dsRNA after incubation with human and murine serum and subsequent electrophoretic separation in 20% 7 M urea gel.

Fig. 10: Incubation of S2 (0-22-0) in mouse serum

1. at time 0 (without serum)
2. at time 0
3. for 30 minutes
4. for 1 hour
5. for 2 hours
6. for 4 hours

7. for 12 hours
8. 2 μ L 100 μ M S1 without incubation
- S1A) Sense strand S1 (10 μ L 20 μ M S1A)
- S1B) Anti-sense strand S1 (10 μ L 20 μ M S1B)

Fig. 11: Incubation of S1 (0-22-0) in human serum

1. 2 μ L 100 μ M S1 untreated (without incubation)
2. for 30 minutes
3. for 2 hours
4. for 4 hours
5. for 6 hours
6. for 8 hours
7. for 12 hours
8. for 24 hours
- S1A) Sense strand S1 (10 μ L 20 μ M S1A)
- S1B) Anti-sense strand S1 (10 μ L 20 μ M S1B)

Fig. 12: Incubation at S7 (2-19-20) in mouse serum

1. at time 0 (without serum)
2. for 30 minutes
3. for 4 hours
4. for 12 hours

Fig. 13: Incubation of S7 (2-19-2) in human serum

1. Sense strand S7 (10 μ L 20 μ M S7A)
2. Anti-sense strand S7 (10 μ L 20 μ M S7B)
3. for 30 minutes
4. for 1 hour
5. for 2 hours
6. for 4 hours
7. for 6 hours

8. for 12 hours
9. for 24 hours
10. at time 0 (without serum)

Fig. 14: Incubation of K3 (2-19-20) in mouse serum

1. Sense strand K3 (10 μ L 20 μ M K3A)
2. Anti-sense strand K3 (10 L 20 μ M K3B)
3. at time 0 (without serum)
4. at time 0 (with serum)
5. for 30 minutes
6. for 1 hour
7. for 2 hours
8. for 4 hours
9. for 12 hours

Fig. 15: Incubation of PKC1/2 (0-22-2) in mouse serum

1. for 30 minutes
2. for 1 hour
3. for 2 hours
4. for 4 hours
5. for 12 hours
6. 2 μ L 100 μ M PKC1/2 (untreated)

Fig. 16: Incubation of S1A/S4B (0-22-2) in human serum

1. at time 0 (without serum)
2. for 24 hours
3. for 12 hours
4. for 8 hours
5. for 6 hours
6. for 4 hours
7. for 2 hours

8. for 30 minutes
9. Sense strand S1A (10 μ L 20 μ M S1A)
10. Anti-sense strand S4B (10 μ L 20 μ M S4B)

Fig. 17: Incubation of K2 (2-22-2) in human serum

1. Sense strand K2 (10 μ L 20 μ M K2A)
2. Anti-sense strand K2 (10 μ L 20 μ M K2B)
3. at point 0 (without serum)
4. for 30 minutes
5. for 2 hours
6. for 4 hours
7. for 6 hours
8. for 8 hours
9. for 12 hours
10. for 24 hours

Results:

dsRNAs without single-strand regions on the 3' ends are much more stable in both human and murine serum than dsRNAs with single-strand 2nt overhangs on the 3' ends (Figures 10 to 14 and 17). After 12 and 24 hours incubation at S1 in murine or human serum, bands in the original size are almost fully retained. On the other hand, in dsRNAs with 2nt overhangs on both 3' ends, the stability in human and murine serum diminishes significantly. After only 4 hours of incubation of S7 (Figures 12 and 13) or K3 (Fig. 14), no bands can be detected in the original size.

In order to increase the stability of dsRNA in serum, it is sufficient if the dsRNA has a smooth end. In mouse serum after 4 hours incubation (Fig. 15, track 4), the bands in the original size are scarcely broken down in comparison with S7 (after 4 hours complete degradation; Fig. 12, track 3).

As an optimal compromise with respect to biological efficacy of dsRNA, the use of dsRNA with a smooth end and a single-strand region of 2 nucleotides can be considered, in which the single-strand overhang should be situated on the 3' end of the anti-sense strand.

The sequences used here are apparent from the following Table 2 and the sequence protocols SQ148-151 and 153-167.

Name	Sequenz- proto- koll.-Nr.	dsRNA-Sequenz	
S1	SQ148 SQ149	(A) 5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3' - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-0
S7	SQ150 SQ151	(A) 5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3' - CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	2-19-2
K1	SQ153 SQ154	(A) 5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3' - UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-0
K3	SQ155 SQ156	(A) 5' - GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3' (B) 3' - UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5'	2-19-2
K2	SQ157 SQ158	(A) 5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3' - UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-2
S1A/ S4B	SQ148 SQ159	(A) 5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3' - CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-2

PKC 1/2	SQ160	(A)	5' - CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3'	2-22-0
	SQ161	(B)	3' - GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5'	
S7/S12	SQ150	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3'	0-21-0
	SQ162	(B)	3' - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
S7/S11	SQ150	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3'	0-21-2
	SQ163	(B)	3' - CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
S13	SQ164	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACU -3'	0-20-2
	SQ165	(B)	3' - CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
S13/14	SQ164	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACU -3'	0-20-0
	SQ166	(B)	3' - GGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
S4	SQ167	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3'	2-22-2
	SQ159	(B)	3' - CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	
K1A/ K2B	SQ153	(A)	5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3'	0-22-2
	SQ158	(B)	3' - UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
K1B/ K2A	SQ154	(A)	5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3'	2-22-0
	SQ157	(B)	3' - UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
S1B/ S4A	SQ149	(A)	5' - CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3'	2-22-0
	SQ167	(B)	3' - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	

Key to figure: (Headings)

Name

Sequence protocol no.

dsRNA sequence

Table 2

IV. In Vivo Study:

Double-strand RNA (dsRNA) that was derived from the GFP sequence where unspecific dsRNA was injected intravenously into the caudal vein of “GFP laboratory mice” that express the green fluorescent protein (GFP) in all cells that conduct protein biosynthesis. At the end of the experiment, the animals were killed and the GFP expression analyzed in tissue sections and in plasma.

Experimental Protocol:

Synthesis of dsRNA:

By means of an RNA synthesizer (type Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), and ordinary chemical methods, the RNA single strands apparent from the sequence protocols and the single strand complementary to them were synthesized. Purification of the crude synthesis products then occurred with HPLC. As columns, NucleoPac PA-100, 9 × 250 mm from the Dionex company were used; 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile was used as low salt buffer and 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile as high salt buffer. The flow rate was 3 mL/minute. Hybridization of the single strands to a double strand occurred by heating of the stoichiometric mixture of the single strands in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 100 mM NaCl, to 80-90°C and subsequent slow cooling over 6 hours to room temperature.

Experimental Animal Keeping and Performance of the Experiment

The transgenic laboratory mouse strain TgN (GFPU) 5Nagy (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) was used, which expresses GFP (with a beta-actin promoter and a CMV intermediate early enhancer) in all previously investigated cells (Hadjantonakis AK et al. 1993, Mech. Dev. 76: 79-90; Hadjantonakis AK et al., 1998 Nature Genetics 19: 220-222). GFP-transgenic mice can be clearly distinguished from the corresponding wild types (WT) by means of fluorescence (with a UV hand lamp). For breeding, the corresponding WT was paired with a heterozygous GFP type.

The experiment was performed according to the German Animal Protection Regulations. The animals were kept under controlled environmental conditions in groups of 3-5 animals in type III Makrolon cages from the Ehret company, Emmendingen, at a constant temperature of 22°C and a light-dark rhythm of 12 h. Softwood granulate 8/15 from the Altromin company, Lage, was used as sawdust litter. The animals received tap water and standard feed Altromin 1324 pelletized (Altromin) ad libitum.

To perform the experiment, the heterozygous GFP animals were kept in groups of 3 animals each in cages, as described above. Injections of the dsRNA solution occurred intravenously (IV) into the caudal vein in 12-hour cycles (between 5:30 and 7:00 a.m. and between 5:30 and 7:00 p.m.) over 5 days. The injection volumes were 60 µL for per 10 g of body weight and the dose was 2.5 mg dsRNA and 50 µg per kg of body weight. Division into groups was as follows:

- Group A: PBS (phosphate buffered saline) 60 µL per 10 kg of body weight,
- Group B: 2.5 mg per kg of body weight of a nonspecific control dsRNA (K1 control with smooth ends and a double-strand region of 22 nucleotide pairs),
- Group C: 2.5 mg per kg of body weight of another unspecific control dsRNA (K3 control with 2nt overhangs on both 3' ends and a double-strand region of 19 nucleotide pairs),
- Group D: 2.5 mg per kg of body weight dsRNA (specific against GFP, subsequently referred to as S1, with smooth ends and a double-strand region of 22 nucleotide pairs),
- Group E: 2.5 mg dsRNA per kg of body weight (specific against GFP, subsequently referred to as S7, with 2nt overhangs on the 3' ends of both strands and a double-strand region of 19 nucleotide pairs)
- Group F: 50 µg S1-dsRNA per kg of body weight (i.e., 1/50 of the dose of group D).

After the last injection of a total of 10 injections, the animals were killed after 14-20 h and the organs and blood taken as described.

Organ Removal:

Immediately after killing the animals by CO₂ inhalation, blood and different organs were taken (thymus, lungs, heart, spleen, stomach, intestines, pancreas, brain, kidneys and liver). The organs were rinsed briefly in cold sterile PBS and divided with a sterile scalpel. One part was fixed for immunohistochemical staining in methylcarnoys (MC, 60% methanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) for 24 hours, one part was shock frozen for frozen sections and for protein isolation immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C, and another smaller part was frozen for RNA isolation in RNAeasy-Protect (Qiagen) at -80°C. The blood was immediately held for 30 minutes on ice after sampling, mixed, centrifuged for 5 minutes at 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf), the supernatant removed and stored at -80°C (here referred to as plasma).

Processing of the Biopsies:

After 24 h of fixation of the tissue in MC, the tissue pieces were dehydrated in an increasing alcohol series at RT (room temperature): every 40 minutes 70% methanol, 80% methanol, 2 × 96% methanol and 3 × 100% isopropanol. The tissue was then heated in 100% isopropanol to 60°C in an incubator, then incubated for 1 hour in an isopropanol/paraffin mixture at 60°C and 3 × for 2 hours in paraffin and then imbedded in paraffin. For immunoperoxidase staining, tissue sections with 3 µm section thickness were prepared with a rotary microtome (Leica), mounted on slides (Superfrost, Vogel) and incubated for 30 minutes at 60°C in an incubator.

Immunoperoxidase Staining versus GFP:

The sections were deparaffinized 3 × 5 minutes in xylene, rehydrated in an increasing alcohol series (3 × 3 min 100% ethanol, 2 × 2 min 95% ethanol) and then incubated for 20 minutes in 3% H₂O₂/methanol to block endogenous peroxidases. All incubation steps were conducted subsequently in a moist chamber. After 3 × 3 minutes of washing with PBS, they were incubated

with the first antibody (goat anti-GFP, sc-5384, Santa Cruz, Biotechnology) 1:500 in 1% BSA/PBS overnight at 4°C. Incubation with the biotinylated secondary antibody (donkey anti-goat; Santa Cruz Biotechnology; 1:2000 dilution) occurred for 30 minutes at RT, whereupon they were incubated for 30 minutes with Avidin D Peroxidase (1:2000 dilution, Vector Laboratories). After each antibody incubation, the sections were washed 3 × 3 min in PBS and the buffer residues removed from the sections with wadding. All antibodies were diluted in 1% bovine serum albumin (BSA)/PBS. Staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was conducted with the DAB substrate kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's data. As nuclear counterstain, hematoxylin III according to Gill (Merck) was used. After dehydration in a rising alcohol series at 3 × 5 minutes xylene, the sections were covered with Entellan (Merck). Microscopic evaluation of staining occurred with the IX50 microscope from Olympus, equipped with a CCD camera (Hamamatsu).

Protein Isolation from Tissue Pieces:

800 µL isolation buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2.5 mM EGTA; 10% glycerol; 0.1% Tween; 1 mM DTT, 10 mM β-glycerol phosphate; 1 mM NaF; 0.1 mM Na₃VO₄ with a protease inhibitor tablet "Complete" from Roche) were added to the still frozen tissue pieces and homogenized 2 × 30 seconds with an Ultraturrax (DIAX 900, dispersal die 6 G, Heidolph), and cooled in between on ice. After 30 minutes of incubation on ice, they were mixed and centrifuged for 20 minutes at 1000 × g, 4°C (3K30, Sigma). The supernatant was incubated for another 10 minutes on ice, mixed and centrifuged for 20 minutes to 15000 × g, 4°C. A protein determination according to Bradford, 1976, modified after Zor & Selinger, 1996, was conducted with the supernatant with the Roti-Nanoquant system of Roth according to the data of the manufacturer. BSA (bovine serum albumin) in concentrations from 10 to 100 µg/mL was used for the protein calibration line.

SDS Gel Electrophoresis:

Electrophoretic separation of the proteins occurred in a multigel long electrophoresis chamber from Biometra with a denaturing, discontinuous 15% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) according to Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). For this purpose, a

separation gel 1.5 mM thick was initially poured: 7.5 mL acrylamide/bisacrylamide (30%, 0.9%), 3.8 mL 1.5 M tris/HCl, pH 8.4, 150 μ L 10% SDS, 3.3 mL doubly distilled water, 250 μ L ammonium persulfate (10%), 9 μ L TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) and coated up to polymerization with 0.1% SDS. The collected gel was then poured: 0.83 μ L acrylamide/bisacrylamide (30%/0.9%), 630 μ L 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 mL doubly distilled water, 50 μ L 10% SDS, 50 μ L 10% ammonium persulfate, 5 μ L TEMED.

Before application of the gel, the proteins were mixed with a corresponding amount of 4-fold sample buffer (200 mM tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (dithiotreitol), 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol), denatured for 5 minutes in a heating unit at 100°C, briefly centrifuged after cooling on ice and applied to the gel. The same plasma or protein amounts were used per track (3 μ L plasma and 25 μ g total protein each). Electrophoresis occurred water-cooled at RT and a constant 50 V. The protein gel marker from Bio-Rad (kaleidoscope prestained standard) was used as length standard.

Western Blot and Immune Detection:

Transfer of the proteins from SDS-PAGE to a PVDF (polyvinyl difluoride) membrane (Hybond-P, Amersham) occurred in the semi-dry method according to Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) at RT and a constant current intensity of 0.8 mA/cm² for 1.5 h. A Tris/glycine buffer was used as transfer buffer (39 mM glycine, 465 mM Tris, 0.1% SDS and 20% methanol). To check the electrophoretic transfer, both the gels after blotting and the blot membranes after immune detection were stained with Coomassie (0.1% Coomassie G250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid). For saturation of nonspecific bonds, the blot membrane after transfer was incubated in 1% skim milk powder/PBS for 1 h at RT. It was then washed three times for 3 minutes with 0.1% Tween-20/PBS. All subsequent antibody incubations and washing steps occurred in 0.1% Tween-20/PBS. Incubation with the primary antibody (goat anti-GFP, sc 5384, Santa Cruz Biotechnology) occurred in a dilution of 1:1000 for 1 h at RT. It was then washed 3 \times 5 min and incubated for 1 hour at RT with a secondary antibody (donkey anti-goat IgG horseradish peroxidase labeled, Santa Cruz Biotechnology) in a dilution of 1:1000. Detection occurred with the ECL system from Amersham according to the data of the manufacturer.

Figures 18 to 20 show inhibition of GFP expression after intravenous injection of dsRNA specifically directed against GFP with immunoperoxidase staining relative to GFP on 3 μ m paraffin sections. During the experiment, dsRNA directed against GFP with a double-strand region of 22 nucleotide (nt) pairs without overhangs on the 3' ends (D) and the corresponding unspecific control dsRNA (B), as well as dsRNA directed specifically against GFP with a double-strand region containing 19 nucleotide pairs with 2 nt overhangs on the 3' ends (E) and the corresponding nonspecific control dsRNA (C) were applied in 12-hour cycles over 5 days. (F) received 1/50 of the dose of group D. Animals without dsRNA administration (A) and WT animals were investigated as additional controls. Fig. 18 shows inhibition of GFP expression in kidney sections, Fig. 19 in heart tissue and Fig. 20 in pancreas tissue. Figures 21 to 23 show Western blot analyses of GFP expression in plasma and tissues. Inhibition of GFP expression in plasma is shown in Fig. 21, in the kidneys in Fig. 22 and in the heart in Fig. 23. Total protein isolates from different animals are shown in Fig. 23. The same total protein amounts per track were applied. In the animals, to which unspecific control dsRNA was administered (animals of groups B and C), the GFP expression relative to animals that received no dsRNA is not reduced. Animals that received dsRNA specifically directed against GFP with 2 nt overhangs on the 3' ends of both strands and a double-strand region containing 19 nucleotide pairs exhibited a significantly inhibited GFP expression in the investigated tissues (heart, kidneys, pancreas and blood), compared with the untreated animals (Figures 18 to 23). In the animals of groups D and F, in which dsRNA directed specifically against GFP with smooth ends and double-strand region containing 22 nucleotide pairs was administered, only those animals that received dsRNA in a dose of 50 μ g/kg of body weight per day exhibited a specific inhibition of GFP expression, which, however, was much less pronounced than that of the animals in group E. The summarizing evaluation of GFP inhibition in the tissue sections and in Western blot shows that inhibition of GFP expression in blood and the kidneys is strongest (Figures 18, 21 and 22).

V. Inhibition of Gene Expression of EGF Receptor with dsRNA as a Therapeutic Approach in Forms of Cancer with EGFR Overexpression or EGFR-induced Proliferation:

The epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) belongs to the receptor tyrosine kinases, transmembrane proteins with an intrinsic tyrosine kinase activity, which participate in the control

of a series of cellular processes, like cell growth, cell differentiation, migratory processes or cell vitality (review in: Van der Geer et al. 1994). The EGFR family consists of 4 members, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4) with a transmembrane domain, a cysteine-rich extracellular domain and an intracellular catalytic domain. The sequence of EGFR, a 170 kDa protein, has been known since 1984 (Ullrich et al., 1984).

EGFR is activated by peptide growth factors, like EGF, TGF α (transforming growth factor), amphiregulin, beta-cellulin, HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) and neureguline. Ligand bonding induces formation of homo- or heterodimers with subsequent autophosphorylation of cytoplasmic tyrosine (Ullrich & Schlessinger, 1990; Alroy & Yarden, 1997). The phosphorylated amino acids form the bonding sites for a number of proteins that participate in the proximal steps of signal conduction in a complex network. EGFR participates in a wide variety of tumor diseases and is therefore a suitable target for therapeutic approaches (Huang & Harari, 1999). The mechanisms that lead to an aberrant EGFR activation can be due to overexpression, amplification, constituted activation of mutant receptor forms or autocrine loops (Voldborg et al., 1997). An overexpression of EGFR was described for a number of tumors, like breast cancer (Walker & Dearing, 1999), non-small lung carcinoma (Fontanini et al., 1998), pancreatic carcinomas, colon carcinoma (Salomon et al., 1995) and glioblastomas (Rieske et al., 1998). No efficient and specific therapeutic agents have thus far been available for malignant glioblastomas, in particular.

Practical Example:

To demonstrate the efficacy of dsRNA during specific inhibition of EGFR gene expression, U-87 MG cells (human glioblastoma cells), ECCAC (European Collection of Animal Cell Cultures) no. 89081402 were used, which were transfected with dsRNA directed specifically against the EGF receptor (sequence protocol SQ 51). After about 72 hours' incubation, the cells were harvested, the protein isolated and the EGFR expression investigated in the Western blot method.

Experimental Protocol:

dsRNA Synthesis:

By means of an RNA synthesizer (type Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and an ordinary chemical method, the RNA single strands apparent from the sequence protocols and the single strands complementary to them were synthesized. Purification of the crude synthesis products then occurred with HPLC. The column NucleoPac PA-100, 9 × 250 mm, from the Dionex company was used; 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile was used as low salt buffer and 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6.8, 10% acetonitrile as high salt buffer. The flow rate was 3 mL/minute. Hybridization of the single strands to a double-strand occurred by heating of the stoichiometric mixture of the single strands in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, 100 mM NaCl, to 80-90°C and subsequent slow cooling over 6 hours to room temperature.

Seeding of the Cells:

All cell culture work was conducted under sterile conditions and an appropriate work bench (HS18, Her safe, Kendro, Heraeus). Cultivation of U-87 MG cells occurred in an incubator (CO₂ incubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) at 37°C, 5% CO₂ and saturated atmospheric humidity in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom) with 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-glutamine (Biochrom), 1 mM sodium pyruvate (Biochrom), 1 × NEAA (nonessential amino acids, Biochrom) and penicillin/streptomycin (100 IU/100 µg/mL, Biochrom). In order to keep the cells in the exponential growth phase, the cells were subjected to passage every 3 days. 24 hours before application of dsRNA by transfection, the cells were trypsinized (10 × trypsin/EDTA, Biochrom, Germany) and seeded with a cell density of 5×10^5 cells/well in a 6-well plate (6-well plates, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 1.5 mL growth medium.

Application of dsRNA in Cultivated U-87 MG Cells:

Application of dsRNA occurred by transfection with OLIGOFECTAMINE™ reagent (Life Technologies) according to the information of the manufacturer. The total transfection volume was 1 mL. The dsRNA was first diluted in serum-free medium: for this purpose, 0.5 µL of a 20

μ m stock solution of dsRNA specifically directed against EGFR and 9.5 μ L of a 20 μ m stock solution of unspecific dsRNA (K1A/K2B) with 175 μ L serum-free medium were diluted per well (200 nM dsRNA in transfection charge and 10 nM specific EGFR-dsRNA). The OLIGOFECTAMINE™ reagent was also diluted in serum-free mediums: 3 μ L with 12 μ L medium per well and then incubated for 10 minutes at room temperature. The diluted OLIGOFECTAMINE™ reagent was then added to the dsRNAs diluted in medium, mixed and incubated for another 20 minutes at RT. During incubation, a medium change was performed. The cells were washed for this purpose once with 1 mL serum-free medium and incubated further in the incubator with 800 μ L serum-free medium, up to addition of dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ reagent. After addition of 200 μ L dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ reagent per well, the cells were further incubated in the incubator to protein isolation.

Protein Isolation:

About 72 hours after transfection, the cells were harvested and protein isolation carried out. For this purpose, the medium was removed and the cell monolayer washed once with PBS. After addition of 200 μ L protein isolation buffer (1 \times protease inhibitor “Complete”, Roche, 50 mM HEPES, pH 7.5, 1509 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 10% glycerol, 0.1% Tween-20, 1 mM DTT, 10 mM β -glycerol phosphate, 1 mM NaF, 0.1 mM Na_3VO_4), the cells were separated by means of a cell scraper, incubated for 10 minutes on ice, transferred to an Eppendorf reaction vessel and stored at -80°C for at least 30 minutes. After thawing, the lysate was homogenized on stage 3 for 10 seconds with a disperser (DIAX 900, dispersing die 6G, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach), incubated on ice for 10 minutes and centrifuged for 15 minutes at $14000 \times g$, 4°C (3K30, Sigma). A protein determination was conducted with the supernatant according to Bradford with the Roti® Nanoquant system from Roth (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) according to the information of the manufacturer. For this purpose, 200 μ L protein solution in appropriate dilution was mixed with 800 μ L 1 \times working solution and the extinction measured in semi-microcells at 450 and 590 nm versus distilled water in a Beckman spectrophotometer (DU 250). The corresponding BSA dilutions were used for the calibration line (beaded BSA, Sigma).

SDS Gel Electrophoresis:

Electrophoretic separation of the proteins occurred in a multi-gel long electrophoresis chamber from Biometra with a denaturing, discontinuous 7.5% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) according to Lämmli (Nature 277: 680-685, 197). For this purpose, a separation gel was initially poured with 1.5 mm thickness: 3.7 mL acrylamide/bisacrylamide (30%, 0.9%), 3.8 mL 1 M Tris/HCl, pH 8.4, 150 μ L 10% SDS, 7.15 mL doubly distilled water, 150 μ L ammonium persulfate (10%), 9 μ L TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) and coated with 0.1% SDS to polymerization. The collection gel was then poured: 0.83 mL acrylamide/bisacrylamide (30%/0.9%), 630 μ L 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 mL doubly distilled water, 50 μ L 10% SDS, 50 μ L 10% ammonium persulfate, 5 μ L TEMED.

For application to the gel, the protein samples were mixed 1:3 with 4 \times sample buffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (dithiotreitol), 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol), denatured for 5 minutes at 100°C, briefly centrifuged after cooling on ice and applied to the gel. 35 μ g total protein was applied per track. The run occurred water cooled at RT and a constant 50 V. The kaleidoscope protein gel marker (BioRad) was used as length standard.

Western Blot and Immunodetection:

Transfer of the proteins from SDS-PAGE to a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Hybond-P, Amersham) occurred in the semi-dry method according to Kyte-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) at RT and a constant current intensity of 0.5 mA/cm² for 1.5 h. The following were used as transfer buffer: cathode buffer (30 mM Tris, 40 mM glycine, 10% methanol, 0.01% SDS; pH 9.4), anode buffer I (300 mM Tris, pH 10.4, 10% methanol) and anode buffer II (30 mM Tris, pH 10.4, 10% methanol). Before combining the blot stack with 3 mm Whatman paper (Schleicher & Schüll), the gel was incubated in the cathode buffer and the PVDF membrane (30 seconds beforehand in 100% methanol) in anode buffer II (5 min): 2 layers 3 mm paper (anode buffer I), 1 layer 3 mm paper (anode buffer II), PVDF membrane, gel, 3 layers 3 mm paper (cathode buffer). To check electrophoretic transfer, both the gels after blotting and the blot membranes after immunodetection were stained with Coomassie (0.1% Coomassie G250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid).

The blot membrane was incubated after transfer in 1% skim milk powder/ PBS/0.1% Tween-20 for 1 h at RT. It was then washed three times for 3 minutes with 0.1% Tween-20/PBS. All subsequent antibody incubations and washing steps occurred in 0.1% Tween-20/PBS. Incubation with the primary antibody (human EGFR extracellular domain, specific goat IgG, catalog no. AF231, R&D Systems) occurred on a rocking device for 2 h at RT and a concentration of 1.5 µg/mL. It was then washed 3 × for 6 minutes and incubated for 1 hour at RT with the secondary antibody (donkey anti-goat IgG horseradish peroxidase label, Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:10000). After washing (3 × 3 min in PBS/0.1% Tween-20), detection occurred immediately with ECL reaction (enhanced chemiluminescence): 200 µL solution A (250 mM luminol, Roth, dissolved in DMSO), 89 µL solution B (90 mM p-coumaric acid, Sigma, dissolved in DMSO) and 2 mL 30% H₂O₂ solution were pipetted into 18 mL distilled water. Depending on the membrane size, 4-6 mL was pipetted directly onto the membrane, incubated for 1 minute at RT and then an x-ray film (Biomax MS, Kodak) applied immediately.

The sequences used here are shown in the following Table 3 and in the sequence protocols S!153, 157, 158, 168-173.

ES-7	SQ168	(A) 5' - AACACCGCAGCAUGUCAAGAU -3'	2-19-2
	SQ169	(B) 3' - UUUGUGGCGUCGUACAGUUC -5'	
ES-8	SQ170	(A) 5' - AAGUUA AAAU UCCCGUCGCUAU -3'	2⁵-19-2⁵
	SQ171	(B) 3' - CAAUUUAAGGGCAGCGAUAGU -5'	
ES2A/ ES5B	SQ172	(A) 5' - AGJGUGAUCCAAGCUGUCCCAA -3'	0-22-2
	SQ173	(B) 3' - UUUCACACUAGGUUCGACAGGGJU -5'	
K2	SQ157	(A) 5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3'	2-22-2
	SQ158	(B) 3' - UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	

K1A/ K2B	SQ153 SQ158	(A) 5' - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3' - UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-2
-------------	----------------	--	--------

Table 3

Inhibition of EGFR Expression in U-87 MG Glioblastoma Cells:

24 hours after seeding of the cells, they were transfected with 10 nM dsRNA as stated (oligofectamine). After 72 hours, the cells were harvested and the protein isolated. Separation of the proteins occurred in 7.5% SDS-PAGE. 35 µg total protein was applied per track. Fig. 4 shows the corresponding Western blot analysis, from which it follows that the EGFR expression after transfection in U-87 MG cells can be significantly inhibited relative to the corresponding controls with the dsRNA specifically directed against the EGFR gene with a 2 nt overhang on the 3' end of the anti-sense strand. This inhibition of expression of an endogenous gene by specific dsRNA therefore confirms the results stated in the practical example II concerning inhibition of expression of an artificial gene introduced to the cell after transient transfection. The inhibition of EGFR expression mediated by ES-7 and ES-8 is much lower. The dsRNAs used in Fig. 24 can be gathered from Table 3.

VI. Inhibition of Expression of the Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1):

Experimental Protocol:

In vitro detection for blocking of MDR1 expression was conducted in the colon carcinoma cell line LS174T (ATCC – American Type Culture Collection, Tom et al., 1976). It is known of this cell line that expression of MDR1 can be induced by addition of rifampicin to the culture medium (Geick et al., 2001). Transfections were conducted with different commercial transfection kits (Lipofectamine, Oligofectamine, both Invitrogen; TransMessenger, Qiagen), in which the TransMessenger transfection kit also proved to be best suited for this cell line.

To run the RNA interference experiments, 4 short double-strand ribonucleic acids R1-R4 were used, whose sequences are shown in Table 4. The ribonucleic acids are homologous with sections of the coding sequence of MDR1 (sequence protocol SQ 30). Sequences R1-R3 consists of a 22-mer sense and a 24-mer anti-sense strand, in which the forming double-strand has a two nucleotide overhang on the 3' end of the anti-sense strand (0-22-2). The sequence R4 corresponds to R1, but consists of a 19-mer double strand with 2 nucleotide overhangs on each 3' end (2-19-2).

<u>Name</u>	<u>Sequenz- proto- koll-Nr.</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Position in Daten- bank-#</u> AF016535
Seq R1	SQ141 SQ142	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG A-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA UUC U-5'	1320-1342 1335-1318
Seq R2	SQ143 SQ152	5' - UAU AGG UUC CAG GCU UGC UGU A-3' 3' -CG AUA UCC AAG GUC CGA ACG ACA U-5'	2599-2621 2621-2597
Seq R3	SQ144 SQ145	5' - CCA GAG AAG GCC GCA CCU GCA U-3' 3' -UC GGU CUC UUC CGG CGU GGA CGU A-5'	3778-3799 3799-3776
Seq R4	SQ146 SQ147	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA U -5'	1320-1341 1339-1318
			<u>Position in Daten- bank-#</u> AF402779
K1A/ K2B	SQ153 SQ158	5' - ACA GGA UGA GGA UCG UUU CGC A-3' 3' -UC UGU CCU ACU CCU AGC AAA GCG U-5'	2829-2808 2808-2831

Key to figure: (Headings)

Name

Sequence Protocol no.

Sequence

Table 4

The sequences shown in Table 4 are shown again in the sequence protocol as sequences SQ 141-147, 152, 153, 158. The dsRNAs were transfected in a concentration of 175 nM as double charges into the cells, which were seeded the day before in 12-well plates at 3.8×10^5 cells/well. For this purpose, 93.3 μ L EC-R buffer (TransMessenger kit, Qiagen, Hilden) was mixed with 3.2 μ L Enhancer-R per transfection charged, thoroughly mixed and incubated for 5 minutes at room temperature. After addition of 6 μ L TransMessenger transfection reagent, the transfection charges were vigorously mixed for 10 seconds and incubated for 10 minutes at room temperature. In the meantime, the medium was withdrawn from the cells by suction, washed once with PBS (phosphate buffered saline) and 200 μ L fresh medium without FCS per well was added to the cells. After 10 minutes of incubation, 100 μ L FCS-free medium was pipetted into the transfection charged, mixed and the mixture pipetted dropwise into the cells (the dsRNA concentration of 175 μ M refers to 400 μ L of medium total volume). The dsRNA/TransMessenger complexes were incubated for 4 hours at 37°C with the cells in FCS-free medium. A medium change was then conducted, in which the fresh medium contained 10 μ M Rifampicin and 10% FCS. As control, and unspecific dsRNA sequence, having no homology with the MDR1 gene sequence, was used (K) and a MOCK transfection carried out, which contained all reagents, except dsRNA.

The cells were harvested after 24, 48 and 72 hours and a total RNA extracted with the RNeasy-Mini-Kit from Qiagen. 10 μ g total RNA of each sample was separated on a 1% agarose formaldehyde gel electrophoretically, blotted onto a nylon membrane and specific probes, random marked with 5'- α^{32} -P-dCTP, were hybridized exposed first relative to MDR1 and, after stripping of the blot, relative to GAPDH as internal control and exposed on x-ray film.

The x-ray films were digitized (Image Master, VDS Pharmacia) and quantified with the Image-Quant software. Balancing of the MDR1-specific bands with the corresponding GAPDH bands was then carried out.

Results:

Figures 25 and 26 show Northern blots (Figures 25a, 26a) with quantitative evaluation of the MDR1-specific bands after balancing with the corresponding GAPDH values (Figures 25b, 26b). A reduction of MDR1-mRNA by up to 55% could be observed in comparison with MOCK transfection and by up to 45% in comparison with unspecific control transfection. After 48 h, a significant reduction of MDR1-mRNA levels was achieved with the dsRNA constructs designated R1, R2, R3 (Table 4). After 48 hours, no significant reduction relative to the controls was observed with the R4 dsRNA constructs (Figures 26a, 26b). After 72 hours, a much stronger reduction of MDR1-mRNA levels was observed with R1, R2 and R2 relative to the controls, in comparison with the 48-hour values (Figures 25a and 25b).

With R4 at this point a significant reduction of MDR1-mRNA levels could also be achieved. The constructs with a 2 nt overhang on the 3' end of the anti-sense strand and a double-strand region of 22 nucleotide pairs therefore reduced the MDR1-mRNA more efficiently than the constructs of the 2 nt overhangs on the 3' ends of both strands (anti-sense and sense strand) and a double-strand region of 19 nucleotide pairs relatively independently of the sequence region homologous to the MDR1 gene (after 48 hours; Fig. 26b). The results therefore confirm the inhibition of EGFR gene expression described in practical example 4 by specific dsRNAs after transfection in U-87 MG cells.

The transfection efficiency was determined in a separate experiment by means of a Texas-Red-labeled DNA oligonucleotide (TexRed-A (GATC)₅T; also 175 nM transfected) (Figures 27a, 27b; 400-fold magnification, 48 hours after transfection). The amount is about 50% based on the red fluorescent cells, in comparison with the total cell count. If one considers the transfection rate of the cells at about 50%, the observed reduction of MDR1-mRNA level lies at about 45-55% (compared with the controls), with the conclusion that in all cells that could be transfected

successfully with specific dsRNA, the MDR1-mRNA was almost fully broken down and specifically.

Literature:

Alroy I & Yarden Y (1997): The Erb signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letters 410: 83-86.

Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.

Bosher, J.M. and Labouesse, M., 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nature Cell Biology 2, E31-E36.

Bradford MM (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R.A., 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 252, 95-105.

Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Mamehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6499-6503.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehernbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G & Slamon DJ (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that

has progressed after chemotherapy for metastatic disease.
Journal of Clinical Oncology 17: 2639-2648.

Ding, S.W., 2000. RNA silencing. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 152-156.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.

Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet. 15, 358-363.

Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H., 1986. Improved free-energy parameters for prediction of RNA duplex stability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377 .

Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J. Biol. Chem. 276 (18), 14581-14587.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G & Ciardiello F (1998): Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic factors of survival. Clinical Cancer Research 4: 241-249.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.

Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell*, 82, 693-696.

Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1993): Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76: 79-90.

Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1998): Non-invasive sexing of preimplantation mammalian embryos. *Nature Genetics* 19: 220-222.

Kyhse-Anderson J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-210.

Lämmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Loc, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.

Huang SM & Harari PM (1999): Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Investigational New Drugs* 17: 259-269.

Limmer, S., Hofmann, H.-P., Ott, G., and Sprinzl, M., 1993. The 3'-terminal end (NCCA) of tRNA determines the structure and

stability of the aminoacyl acceptor stem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 , 6199-6202.

Montgomery, M.K. and Fire, A., 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. Trends Genet. 14, 255-258.

Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A., 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502-15507.

Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Bienhat W & Liberski PP (1998): A comparative study of epidermal growth factor (EGFR) and mdm2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. Polish Journal of Pathology 49: 145-149.

Robert, J. (1999). Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. Europ J Clin Invest 29, 536-545.

Stavrovskaya, A.A. (2000) Biochemistry (Moscow) 65 (1), 95-106.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F & Normanno N (1995): Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies: Critical Reviews in Oncology and Haematology 19: 183-232.

Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), In vitro, 12, 180-191.

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41, 1967-72.

Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K., 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett.* 479, 79-82.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Liebermann TA, Schlessinger J et al. (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequences and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.

Ullrich A & Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.

Van der Geer P, Hunter T & Linberg RA (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual review in Cell Biology* 10: 251-337.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M & Poulsen HS (1997): Epidermal growth factor Receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8: 1197-1206.

Walker RA & Dearing SJ (1999): Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment* 53: 167-176.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P., 2000.
RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage
of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zor T & Selinger Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236: 302-308.

Claims

1. Method for inhibition of expression of a target gene in a cell, comprising the following steps:

introduction of at least one double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) in an amount sufficient to inhibit expression of the target gene,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides at least on one end (E1, E2) of dsRNA I.

2. Method according to Claim 1, in which the dsRNA has the overhang on a 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

3. Method according to Claim 1 or 2, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).

4. Method according to Claim 3, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).

5. Method according to one of the preceding claims, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably 1 or 2 nucleotides.

6. Method according to one of the preceding claims, in which at least one additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the preceding claims, is introduced to the cell, in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the target gene, and in which

an additional strand (as2) or at least a section of the additional strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.

7. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I and/or dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.
8. Method according to one of the preceding claims, in which the first region (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.
9. Method according to one of the preceding claims, in which the first region (B1) and the second region (B2) are spaced from each other.
10. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene has one of the sequences SQ001 to SQ140.
11. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.
12. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is the MDR1 gene.
13. Method according to one of the preceding claims, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a combined dsRNA construct of the sequences SQ141-173 from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.
14. Method according to one of the preceding claims, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.

15. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
16. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is a component of a virus or a viroid.
17. Method according to Claim 16, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.
18. Method according to one of the Claims 16, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
19. Method according to one of the preceding claims, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphate.
20. Method according to one of the preceding claims, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA I/II is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
21. Method according to one of the preceding claims, in which the cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.
22. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
23. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).

24. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
25. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs instead of nucleotides.
26. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by purine analogs.
27. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
28. Method according to one of the preceding claims, in which, to produce the chemical link, at least one of the following groups is used: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil, psoralene.
29. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
30. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of the ends (E1, E2).
31. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
32. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one viral sheath protein originating from the virus, derived from it or synthetically produced, associated with it or enclosed by it.

33. Method according to one of the preceding claims, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
34. Method according to one of the preceding claims, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
35. Method according to one of the preceding claims, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.
36. Method according to one of the preceding claims, in which one strand (as1/as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
37. Method according to one of the preceding claims, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.
38. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is administered in an amount of, at most, 5 mg per kilogram of body weight per day to a mammal, preferably a human.
39. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution for application.
40. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is administered orally or by means of injection or infusion, intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.
41. Use of a double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) to inhibit expression of a target gene in a cell,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA I has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides at least on one end (E1, E2).

42. Use according to Claim 41, in which the dsRNA I has the overhang on the 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

43. Use according to Claim 41 or 42, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).

44. Use according to Claim 43, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).

45. Use according to one of the Claims 41 to 44, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably one or two nucleotides.

46. Use according to one of the Claims 41 to 45, in which one additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the Claims 41 to 45, is introduced to the cell, in which the one strand (as1) or at least a section of the one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the sense strand of the target gene, and in which the other strand (as2) or at least a section of the other strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.

47. Use according to one of the Claims 41 to 46, in which the dsRNA I and/or the dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.

48. Use according to one of the Claims 41 to 47, in which the first (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.

49. Use according to one of the Claims 41 to 48, in which the first (B1) and the second region (B2) are spaced from each other.
50. Use according to one of the Claims 41 to 49, in which the target gene has the sequences S1001 to SQ140.
51. Use according to one of the Claims 41 to 50, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell-surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.
52. Use according to one of the Claims 41 to 51, in which the target gene is the MDR1 gene.
53. Use according to one of the Claims 41 to 52, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a dsRNA construct of sequences SQ141-173 combined from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.
54. Use according to one of the Claims 41 to 53, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.
55. Use according to one of the Claims 41 to 54, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
56. Use according to one of the Claims 41 to 55, in which the target gene is a component of a virus or viroid.
57. Use according to Claim 56, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.

58. Use according to Claim 56, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
59. Use according to one of the Claims 41 to 58, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphates.
60. Use according to one of the Claims 41 to 59, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
61. Use according to one of the Claims 41 to 60, in which cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.
62. Use according to one of the Claims 41 to 61, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, a hydrophobic interaction, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
63. Use according to one of the Claims 41 to 62, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).
64. Use according to one of the Claims 41 to 63, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
65. Use according to one of the Claims 41 to 64, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs used instead of nucleotides.
66. Use according to one of the Claims 41 to 65, in which the chemical link is formed by purine analogs.

67. Use according to one of the Claims 41 to 66, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
68. Use according to one of the Claims 41 to 67, in which at least one of the following groups is used to produce the chemical link: methylene blue; bifunctional groups, preferably (bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
69. Use according to one of the Claims 41 to 68, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
70. Use according to one of the Claims 41 to 69, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of ends (E1, E2).
71. Use according to one of the Claims 41 to 70, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
72. Use according to one of the Claims 41 to 71, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one viral sheath protein originating from a virus, derived from it or a synthetically produced viral sheath protein, associated with it or enclosed by it.
73. Use according to one of the Claims 41 to 72, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
74. Use according to one of the Claims 41 to 73, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
75. Use according to one of the Claims 41 to 74, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.

76. Use according to one of the Claims 41 to 75, in which one strand (as1, as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

77. Use according to one of the Claims 41 to 76, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.

78. Use according to one of the Claims 41 to 77, in which the dsRNA I/II is administered in an amount of, at most, 5 mg per kilogram of body weight per day to a mammal, preferably a human.

79. Use according to one of the Claims 41 to 78, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution for application.

80. Use according to one of the Claims 41 to 79, in which the dsRNA I/II is administered orally or by injection or infusion intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.

81. Medicament to inhibit expression of a target gene in a cell, containing a double-strand ribonucleic (dsRNA I) in an amount sufficient to inhibit expression of a target gene,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs,

and in which one strand (as1) or at least one section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA I has an overhang formed on at least one end (E1, E2) from 1 to 4 nucleotides.

82. Medicament according to Claim 81, in which the dsRNA I has the overhang on the 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

83. Medicament according to Claim 81 or 82, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).
84. Medicament according to one of the Claims 83, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).
85. Medicament according to one of the Claims 81 to 84, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably 1 or 2 nucleotides.
86. Use according to one of the Claims 81 to 85, containing at least one additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the Claims 81 to 85, in which the one strand (as1) or at least a section of the one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the target gene, and in which the additional strand (as2) or at least a section of the additional strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.
87. Use according to one of the Claims 81 to 86, in which the dsRNA I and/or the dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.
88. Use according to one of the Claims 81 to 87, in which the first (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.
89. Use according to one of the Claims 81 to 88, in which the target gene has one of the sequences S1001 to SQ140.
90. Use according to one of the Claims 81 to 89, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell-surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.

91. Use according to one of the Claims 81 to 90, in which the target gene is the MDR1 gene.
92. Use according to one of the Claims 81 to 91, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a dsRNA construct of sequences SQ141-173 combined from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.
93. Use according to one of the Claims 81 to 92, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.
94. Use according to one of the Claims 81 to 93, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
95. Use according to one of the Claims 81 to 94, in which the target gene is a component of a virus or viroid.
96. Use according to Claim 95, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.
97. Use according to Claim 95, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
98. Use according to one of the Claims 81 to 97, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphates.
99. Use according to one of the Claims 81 to 98, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
100. Use according to one of the Claims 81 to 99, in which cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.

101. Use according to one of the Claims 81 to 100, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, a hydrophobic interaction, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
102. Use according to one of the Claims 81 to 101, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).
103. Use according to one of the Claims 81 to 102, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
104. Use according to one of the Claims 81 to 103, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs used instead of nucleotides.
105. Use according to one of the Claims 81 to 104, in which the chemical link is formed by purine analogs.
106. Use according to one of the Claims 81 to 105, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
107. Use according to one of the Claims 81 to 106, in which at least one of the following groups is used to produce the chemical link: methylene blue; bifunctional groups, preferably (bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
108. Use according to one of the Claims 81 to 107, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
109. Use according to one of the Claims 81 to 108, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of ends (E1, E2).

110. Use according to one of the Claims 81 to 109, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
111. Use according to one of the Claims 81 to 110, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one viral sheath protein originating from a virus, derived from it or a synthetically produced viral sheath protein, associated with it or enclosed by it.
112. Use according to one of the Claims 81 to 111, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
113. Use according to one of the Claims 81 to 112, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
114. Use according to one of the Claims 81 to 113, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.
115. Use according to one of the Claims 81 to 114, in which one strand (as1, as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
116. Use according to one of the Claims 81 to 114, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.
117. Use according to one of the Claims 81 to 116, in which the first (B1) and second region (B2) are spaced from each other.
118. Use according to one of the Claims 81 to 117, in which the dsRNA I/II is contained in an amount of, at most, 5 mg per administration unit.
119. Use according to one of the Claims 81 to 118, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution.

120. Use according to one of the Claims 81 to 119, in which the dsRNA I/II is administered orally or by injection or infusion intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.

121. Method for inhibition of expression of a target gene in a cell, comprising the following steps:

introduction of at least one double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) in an amount sufficient to inhibit expression of the target gene,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides on at least one end (E1, E2) of dsRNA I.

122. Method according to Claim 1, in which the dsRNA has the overhang on a 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

123. Method according to Claim 1 or 2, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).

124. Method according to Claim 3, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).

125. Method according to one of the preceding claims, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably 1 or 2 nucleotides.

126. Method according to one of the preceding claims, in which at least an additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the

preceding claims, is introduced to the cell, in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the target gene, and which an additional strand (as2) or at least a section of the additional strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.

127. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I and/or dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.

128. Method according to one of the preceding claims, in which the first (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.

129. Method according to one of the preceding claims, in which the first (B1) and the second region (B2) are spaced from each other.

130. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene has one of the sequences SQ001 to SQ140.

131. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.

132. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is the MDR1 gene.

133. Method according to one of the preceding claims, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a dsRNA construct of the sequences SQ141-173 combined from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.

134. Method according to one of the preceding claims, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.
135. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
136. Method according to one of the preceding claims, in which the target gene is a component of a virus or a viroid.
137. Method according to Claim 16, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.
138. Method according to one of the Claims 16, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
139. Method according to one of the preceding claims, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphate.
140. Method according to one of the preceding claims, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA I/II is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
141. Method according to one of the preceding claims, in which the cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.
142. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
143. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).

144. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
145. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs used instead of nucleotides.
146. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by purine analogs.
147. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
148. Method according to one of the preceding claims, in which, to produce the chemical link, at least one of the following groups is used: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil, psoralene.
149. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
150. Method according to one of the preceding claims, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of the ends (E1, E2).
151. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
152. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one sheath protein originating from the virus, derived from it or synthetically produced, associated with it or enclosed by it.

153. Method according to one of the preceding claims, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
154. Method according to one of the preceding claims, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
155. Method according to one of the preceding claims, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.
156. Method according to one of the preceding claims, in which one strand (as1/as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
157. Method according to one of the preceding claims, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.
158. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is administered in an amount of, at most, 5 mg per kilogram of body weight per day to a mammal, preferably a human.
159. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution for application.
160. Method according to one of the preceding claims, in which the dsRNA I/II is administered orally or by means of injection or infusion, intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.
161. Use of one of double-strand ribonucleic acid (dsRNA I) to inhibit expression of a target gene in a cell,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs, and in which one strand (as1) or at least a section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA I has an overhang formed from 1 to 4 nucleotides at least on one end (E1, E2).

162. Use according to Claim 41, in which the dsRNA I has the overhang on the 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

163. Use according to Claim 41 or 42, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).

164. Use according to Claim 43, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).

165. Use according to one of the Claims 41 to 44, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably one or two nucleotides.

166. Use according to one of the Claims 41 to 45, in which one additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the Claims 41 to 45, is introduced to the cell, in which the one strand (as1) or at least a section of the one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the sense strand of the target gene, and in which the other strand (as2) or at least a section of the other strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.

167. Use according to one of the Claims 41 to 47, in which the dsRNA I and/or the dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.

168. Use according to one of the Claims 41 to 47, in which the first (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.

169. Use according to one of the Claims 41 to 48, in which the first (B1) and the second region (B2) are spaced from each other.

170. Use according to one of the Claims 41 to 49, in which the target gene has the sequences S1001 to SQ140.

171. Use according to one of the Claims 41 to 50, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell-surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.

172. Use according to one of the Claims 41 to 51, in which the target gene is the MDR1 gene.

173. Use according to one of the Claims 41 to 52, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a dsRNA construct of sequences SQ141-173 combined from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.

174. Use according to one of the Claims 41 to 53, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.

175. Use according to one of the Claims 41 to 54, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

176. Use according to one of the Claims 41 to 55, in which the target gene is a component of a virus or viroid.

177. Use according to Claim 56, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.

178. Use according to Claim 56, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
179. Use according to one of the Claims 41 to 58, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphates.
180. Use according to one of the Claims 41 to 59, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
181. Use according to one of the Claims 41 to 60, in which cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.
182. Use according to one of the Claims 41 to 61, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, a hydrophobic interaction, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
183. Use according to one of the Claims 41 to 62, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).
184. Use according to one of the Claims 41 to 63, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
185. Use according to one of the Claims 41 to 64, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs used instead of nucleotides.
186. Use according to one of the Claims 41 to 65, in which the chemical link is formed by purine analogs.

187. Use according to one of the Claims 41 to 66, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
188. Use according to one of the Claims 41 to 67, in which at least one of the following groups is used to produce the chemical link: methylene blue; bifunctional groups, preferably (bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
189. Use according to one of the Claims 41 to 68, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
190. Use according to one of the Claims 41 to 69, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of ends (E1, E2).
191. Use according to one of the Claims 41 to 70, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
192. Use according to one of the Claims 41 to 71, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one sheath protein originating from a virus, derived from it or a synthetically produced viral sheath protein, associated with it or enclosed by it.
193. Use according to one of the Claims 41 to 72, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
194. Use according to one of the Claims 41 to 73, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
195. Use according to one of the Claims 41 to 74, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.

196. Use according to one of the Claims 41 to 75, in which one strand (as1, as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

197. Use according to one of the Claims 41 to 76, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.

198. Use according to one of the Claims 41 to 77, in which the dsRNA I/II is administered in an amount of, at most, 5 mg per kilogram of body weight per day to a mammal, preferably a human.

199. Use according to one of the Claims 41 to 78, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution for application.

200. Use according to one of the Claims 41 to 79, in which the dsRNA I/II is administered orally or by injection or infusion intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.

201. Medicament to inhibit expression of a target gene in a cell, containing a double-strand ribonucleic (dsRNA I) in an amount sufficient to inhibit expression of a target gene,

in which the dsRNA I has a double-strand structure formed from, at most, 49 consecutive nucleotide pairs,

and in which one strand (as1) or at least one section of one strand (as1) of the double-strand structure is complementary to the target gene,

and in which the dsRNA I has an overhang formed on at least one end (E1, E2) from 1 to 4 nucleotides.

202. Medicament according to Claim 81, in which the dsRNA I has the overhang on the 3' end of one strand (as1) and/or on the 3' end of the other strand (ss1).

203. Medicament according to Claim 81 or 82, in which the dsRNA I is formed smooth on one end (E1, E2).
204. Medicament according to one of the Claims 83, in which the smooth end (E1, E2) contains the 5' end of one strand (as1).
205. Medicament according to one of the Claims 81 to 84, in which the overhang is formed from 1 to 4 nucleotides, preferably 1 or 2 nucleotides.
206. Use according to one of the Claims 81 to 85, containing at least one additional double-strand ribonucleic acid (dsRNA II), formed according to the dsRNA I according to one of the Claims 81 to 85, in which the one strand (as1) or at least a section of the one strand (as1) of dsRNA I is complementary to a first region (B1) of the target gene, and in which the additional strand (as2) or at least a section of the additional strand (as2) of dsRNA II is complementary to a second region (B2) of the target gene.
207. Use according to one of the Claims 81 to 86, in which the dsRNA I and/or the dsRNA II have a length of less than 25, preferably 19 to 23, consecutive nucleotide pairs.
208. Use according to one of the Claims 81 to 87, in which the first (B1) and the second region (B2) overlap or abut each other in sections.
209. Use according to one of the Claims 81 to 88, in which the target gene has one of the sequences S1001 to SQ140.
210. Use according to one of the Claims 81 to 89, in which the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein gene, prion gene, genes of angiogenesis-inducing molecules, of adhesion molecules and of cell-surface receptors, genes of proteins that participate in metastasizing and/or invasive processes, genes of proteinases, as well as apoptosis and cell cycle-regulating molecules.

211. Use according to one of the Claims 81 to 90, in which the target gene is the MDR1 gene.
212. Use according to one of the Claims 81 to 90, in which one of the sequences SQ141-173 is used as dsRNA I/II and a dsRNA construct of sequences SQ141-173 combined from two related anti-sense (as1/2) and sense sequences (ss1/2) is used.
213. Use according to one of the Claims 81 to 92, in which expression is inhibited according to the principle of RNA interference.
214. Use according to one of the Claims 81 to 93, in which the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
215. Use according to one of the Claims 81 to 94, in which the target gene is a component of a virus or viroid.
216. Use according to Claim 95, in which the virus is a human pathogenic virus or viroid.
217. Use according to Claim 95, in which the virus or viroid is an animal or plant pathogenic virus or viroid.
218. Use according to one of the Claims 81 to 97, in which unpaired nucleotides are substituted by nucleoside thiophosphates.
219. Use according to one of the Claims 81 to 98, in which at least one end (E1, E2) of dsRNA is modified, in order to counteract degradation in the cell or dissociation into single strands.
220. Medicament according to one of the Claims 81 to 99, in which cohesion of the double-strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one chemical link.

221. Medicament according to one of the Claims 81 to 100, in which the chemical link is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, a hydrophobic interaction, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.
222. Medicament according to one of the Claims 81 to 101, in which the chemical link is formed in the vicinity of one end (E1, E2).
223. Medicament according to one of the Claims 81 to 102, in which the chemical link is formed by means of one or more compound groups, in which the compound groups are preferably poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or oligoethylene glycol chains.
224. Medicament according to one of the Claims 81 to 103, in which the chemical link is formed by branched nucleotide analogs used instead of nucleotides.
225. Medicament according to one of the Claims 81 to 104, in which the chemical link is formed by purine analogs.
226. Medicament according to one of the Claims 81 to 105, in which the chemical link is formed by azabenzene units.
227. Medicament according to one of the Claims 81 to 106, in which at least one of the following groups is used to produce the chemical link: methylene blue; bifunctional groups, preferably (bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
228. Medicament according to one of the Claims 81 to 107, in which the chemical link is formed by thiophosphoryl groups applied in the vicinity of the ends (E1, E2) of the double-strand region.
229. Medicament according to one of the Claims 81 to 108, in which the chemical link is produced by triple helix bonds situated in the vicinity of ends (E1, E2).

230. Medicament according to one of the Claims 81 to 109, in which the dsRNA I/II is enclosed in micellar structures, advantageously in liposomes.
231. Medicament according to one of the Claims 81 to 110, in which the dsRNA I/II is bonded to at least one viral sheath protein originating from a virus, derived from it or a synthetically produced viral sheath protein, associated with it or enclosed by it.
232. Medicament according to one of the Claims 81 to 111, in which the sheath protein is derived from polyoma virus.
233. Medicament according to one of the Claims 81 to 112, in which the sheath protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of polyoma virus.
234. Medicament according to one of the Claims 81 to 113, in which, during formation of a capsid or capsid-like structure from the sheath protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-like structure.
235. Medicament according to one of the Claims 81 to 114, in which one strand (as1, as2) of dsRNA I/II is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
236. Medicament according to one of the Claims 81 to 114, in which the cell is a vertebrate cell or a human cell.
237. Medicament according to one of the Claims 81 to 116, in which the first (B1) and second region (B2) are spaced from each other.
238. Medicament according to one of the Claims 81 to 117, in which the dsRNA I/II is contained in an amount of, at most, 5 mg per administration unit.

239. Medicament according to one of the Claims 81 to 118, in which the dsRNA I/II is taken up in a buffer solution.

240. Medicament according to one of the Claims 81 to 119, in which the dsRNA I/II is administered orally or by injection or infusion intravenously, intratumorally, by inhalation, intraperitoneally.

//Key to Figures//

Relative Fluoreszenz = Relative fluorescence

Maus = mouse

Mensch = human

MOCK Transfektion = MOCK transfection

Hellfeld = bright field

Variante = variant

Zielgen = target gene

SEQUENZPROTOKOLL = SEQUENCE PROTOCOL

<120> Method for Inhibition of Expression of a Target Gene

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (R1A) of a dsRNA that is homologous to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (R1B) of a dsRNA strand, complementary to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (R2A) of a dsRNA that is homologous to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (R3A) of a dsRNA that is homologous to the MDR1 gene

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (R3B) of a dsRNA, complementary to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (R4A) of a dsRNA that is homologous to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (R4B) of a dsRNA, complementary to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (S1A) of a dsRNA that is homologous to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S1B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S7A) of a dsRNA that is homologous to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (S7B) of a dsRNA that is homologous to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (R2B) of a dsRNA, complementary to the MDR1 sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (K1A) of a dsRNA that is homologous to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (K1B) of a dsRNA, complementary to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (K3A) of a dsRNA that is homologous to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (K3B) of a dsRNA, complementary to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (K2A) of a dsRNA that is homologous to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (K2B) of a dsRNA, complementary to the 5' UTR of the neomycin sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S4B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (PKC1 A) of a dsRNA that is homologous to the protein kinase C sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (PKC2 B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S12B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S11B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (S13A) of a dsRNA that is homologous to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S13B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (S14B) of a dsRNA, complementary to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (S13A) of a dsRNA that is homologous to the YFP or GFP sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (ES-7A) of a dsRNA that is homologous to the human EGFR sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (ES-7B) of a dsRNA, complementary to the human EGFR sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (ES-8A) of a dsRNA that is homologous to the human EGFR sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (ES-8B) of a dsRNA, complementary to the human EGFR sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence sense strand (ES-2A) of a dsRNA that is homologous to the human EGFR sequence

<213> Artificial sequence

<223> Description of artificial sequence anti-sense strand (ES-5B) of a dsRNA, complementary to the human EGFR sequence